



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI UDINE**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA  
IN SCIENZE E TECNOLOGIE CLINICHE  
CICLO XXV**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**RUOLO DEI POLIMORFISMI -308 A/G DEL TNF- $\alpha$ ,  
196 M/R DEL TNFRII E 158 V/F DELL'Fc $\gamma$ RIIIA  
NELLA RISPOSTA AGLI INIBITORI DEL TNF- $\alpha$   
NELLE SPONDILOARTRITI SIERONEGATIVE**

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Salvatore DE VITA

**Dottoranda:**

Dott.ssa Sandra LOMBARDI

**Correlatore:**

Dott. Luca QUARTUCCIO

**ANNO ACCADEMICO  
2012-2013**

# **Indice**

<b>1. Introduzione</b>	<b>pag. 3</b>
<b>2. Obiettivo dello studio</b>	<b>pag. 5</b>
<b>3. Spondiloentesoartriti sieronegative</b>	<b>pag. 6</b>
3.1. Etiopatogenesi	pag. 6
3.2. Classificazione e diagnosi delle Spondiloentesoartriti sieronegative	pag. 15
3.2.1. La Spondiloartrite indifferenziata	pag. 19
3.2.2. La Spondilite anchilosante	pag. 21
3.2.3. L'Artrite psoriasica	pag. 27
3.3. Linee guida e criteri di risposta nelle Spondiloartriti sieronegative	pag. 31
3.4. La terapia delle Spondiloartriti sieronegative	pag. 40
3.4.1. Trattamenti farmacologici convenzionali	pag. 41
3.4.2. Gli inibitori del TNF- $\alpha$	pag. 42
3.4.3. Implicazioni terapeutiche dei nuovi criteri classificativi delle Spondiloartriti sieronegative	pag. 52
3.4.4. Immunogenicità, efficacia e switching degli anti-TNF- $\alpha$	pag. 56
3.4.5. Considerazioni sui costi	pag. 59
3.5. Polimorfismi genici di TNF- $\alpha$ , TNFRII e recettore Fc $\gamma$ RIIIA: analisi della possibile influenza sulla risposta agli inibitori del TNF- $\alpha$ e della suscettibilità allo sviluppo di malattia nelle spondiloentesoartriti sieronegative	pag. 62
3.5.1. Il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$	pag. 62
3.5.2. Il polimorfismo 196 M/R del TNFRII	pag. 66
3.5.3. Il polimorfismo 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA	pag. 69
<b>4. Materiali e metodi</b>	<b>pag. 73</b>
4.1. Caratteristiche dei pazienti e modalità di trattamento	pag. 73
4.2. Valutazione della risposta	pag. 75

4.3. Metodiche di biologia molecolare	pag. 78
4.3.1. Analisi dei polimorfismi genici	pag. 78
4.4. Analisi statistica	pag. 81
5. Risultati	pag. 83
5.1. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$ in pazienti e controlli	pag. 83
5.2. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 196 M/R del TNFRII in pazienti e controlli	pag. 84
5.3. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA in pazienti e controlli	pag. 84
5.4. Polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$ e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ al mese +6, all'ultimo follow-up e persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$	pag. 85
5.5. Polimorfismo 196 M/R del TNFRII e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ al mese +6, all'ultimo follow-up e persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$	pag. 88
5.6. Polimorfismo 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ al mese +6, all'ultimo follow-up e persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$	pag. 89
6. Discussione	pag. 90
7. Conclusioni	pag. 97
8. Bibliografia	pag. 98

## Introduzione

Le Spondiloentesoartriti sieronegative (SpA) costituiscono un gruppo di malattie infiammatorie articolari tra loro correlate da quadri anatomopatologici, clinici e radiologici comuni e per la familiarità. Il gruppo comprende cinque forme: la spondilite anchilosante (SA), le artriti reattive (ARe), l'artrite psoriasica (AP), le artriti associate ad enteropatie croniche e la spondiloartrite indifferenziata (uSpA).

Le caratteristiche che accomunano le diverse forme di spondiloartrite includono la predilezione per l'impegno assiale causa di sacroileite e spondilite; l'artrite periferica tipicamente oligoarticolare ed asimmetrica a carico degli arti inferiori; l'infiammazione delle inserzioni dei tendini e dei legamenti all'osso (entesite); l'esordio dei sintomi in giovane età; la sieronegatività, intesa come assenza del fattore reumatoide; l'aggregazione familiare e l'associazione con l'antigene leucocitario umano (HLA)-B27 del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I). Possono essere coinvolti anche organi extra-articolari quali l'occhio, la cute e il sistema cardiovascolare.

Nella popolazione generale la prevalenza oscilla tra lo 0.5% e l'1.9% (1.5% in Italia)<sup>1</sup>. L'eziopatogenesi è multifattoriale, coinvolgendo sia fattori genetici che ambientali. Fondamentale sembra essere l'associazione con l'allele HLA-B27; a tale proposito i dati indicano che tra i soggetti HLA-B27 positivi il 10% sviluppa una SpA e che tale valore aumenta al 30% considerando soggetti aventi un parente di primo grado affetto.

Le SpA colpiscono spesso soggetti giovani e, se non trattate adeguatamente, possono portare ad un severo grado di disabilità, con conseguente incremento dei costi diretti e soprattutto indiretti. Una diagnosi precoce ed una terapia quanto più possibile mirata risultano fondamentali per ottenere un adeguato controllo del processo flogistico, prevenire i danni strutturali e la disabilità. Nell'ultimo decennio la terapia delle SpA è migliorata radicalmente grazie all'introduzione dei farmaci biologici diretti contro il TNF- $\alpha$ . Anch'essi

tuttavia presentano una discreta percentuale di insuccesso valutabile attorno al 20-40%, non sono esenti da effetti collaterali e hanno un costo molto elevato.

L'identificazione di possibili marcatori genetici di efficacia e tossicità a tali farmaci biologici (farmacogenetica) potrebbe rivelarsi un valido strumento per la selezione del trattamento individuale più appropriato, permettendo mediante lo sviluppo di protocolli terapeutici innovativi una migliore razionalizzazione dei farmaci biologici nelle SpA e la conseguente riduzione dei costi.

## 2

### **Obiettivo dello studio**

Obiettivo principale del presente studio è la ricerca di possibili marcatori genetici implicati nella risposta agli agenti anti-TNF- $\alpha$  nelle spondiloentesoartriti sieronegative.

Si procederà all'analisi dei polimorfismi -308 A/G del TNF- $\alpha$ , 196 M/R del TNFRII e 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA, la cui distribuzione genotipica verrà indagata in una casistica di 189 pazienti affetti da SpA (dei quali 68 con spondilite anchilosante, 80 con artrite psoriasica e 41 con spondiloartrite indifferenziata).

Quindi verrà effettuata la valutazione farmacogenetica, volta all'analisi della possibile associazione tra i suddetti polimorfismi e la risposta al trattamento con i farmaci anti-TNF- $\alpha$  al mese +6, all'ultimo follow-up e la persistenza in trattamento con il primo farmaco biologico.

### 3

## Spondiloentesoartriti sieronegative

### 3.1. Etiopatogenesi

Nonostante l'eziologia e la patogenesi delle SpA rimangano ignote, è generalmente accettata l'ipotesi di una genesi multifattoriale dove un'aberrante risposta del sistema immune a fattori ambientali in un individuo geneticamente predisposto determina lo svilupparsi della malattia.

La scoperta nel 1973 dell'associazione tra l'allele HLA-B27 e la SA ha aperto un nuovo vasto settore di ricerca riguardante il ruolo di tale allele<sup>2</sup>. La prevalenza dell'HLA-B27 varia tra popolazioni di razza ed etnia differenti; nei pazienti affetti da SA le stime variano dal 50% al 95% e superano il 90% nei soggetti bianchi con SA<sup>3</sup>. Fino al 70% dei pazienti con ARe ed in minor misura con AP o artriti associate alle malattie infiammatorie intestinali risulta positivo per l'allele HLA-B27<sup>4</sup>. Nell'AP è stata documentata una maggiore prevalenza nei pazienti con coinvolgimento assiale rispetto agli altri sottogruppi.

Il gene HLA-B27 consta di almeno 27 alleli differenti che codificano per 24 diversi sottotipi proteici (dall'HLA-B\*2701 al B\*2725). Di questi il B\*2706 e il B\*2709 non sembrano essere associati alla SA. Le ricerche effettuate evidenziano sottili differenze fra le proteine codificate dagli alleli associati con le SpA, quali il B\*2705, e quelli non associati alla malattia, come, ad esempio, il B\*2709<sup>5</sup>. Esse includono la conformazione strutturale, il legame proteico, la stabilità termodinamica, l'espressione di superficie cellulare e sono in grado di influenzare il tipo di legame tra i vari ligandi con la proteina traslata. E' stato stimato che nella SA l'allele HLA-B27 contribuisca dal 16% al 50% del rischio genetico totale indicando il coinvolgimento di altri geni. Studi effettuati sul complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) hanno segnalato un'associazione tra l'HLA-Cw\*0602, HLA-B38, HLA-B39 e l'AP<sup>6</sup> e tra l'HLA-B60, l'HLA-DRB1 e la SA<sup>7</sup>.

Gli studi iniziali avevano condotto all'ipotesi del mimetismo molecolare per spiegare l'associazione dell'HLA-B27 con le SpA, suggerendo un coinvolgimento

delle cellule T CD8+ autoreattive nella patogenesi della malattia. La condivisione nei sottotipi associati alla malattia di una regione comune di sei aminoacidi, localizzata all'interno della nicchia per il legame con l'antigene, aveva avvalorato l'ipotesi dell'esistenza di un peptide artritogenico presentato ai linfociti T CD4+ e CD8+<sup>8</sup>. Il diretto ruolo patogenetico dell'HLA-B27 è stato dimostrato grazie allo sviluppo di modelli animale di SpA<sup>9</sup> (topo transgenico per HLA-B27/hbeta2m). In quanto appartenente all'MHC tipo I, la funzione principale dell'HLA-B27 è di presentare l'antigene ai linfociti T CD8+ dopo aver formato un complesso con la beta2microglobulina. Da qui l'ipotesi di un mimetismo molecolare, secondo il quale i linfociti T citotossici (CTL) specifici per un peptide batterico cross-reagiscono con un peptide artritogenico autologo che ne condivide un'omologia di sequenza<sup>10</sup>. La risposta geneticamente determinata dell'ospite verso un fattore ambientale sembrava quindi il meccanismo più probabile per la patogenesi della malattia. In effetti, diverse forme di SpA sono indotte da un'infezione enterica e la *Klebsiella pneumoniae* risulta il germe più implicato, grazie alle scoperte sull'omologia di alcune sequenze del sottotipo B\*2705 con l'antigene appartenente alla nitrogenasi di tale germe<sup>11</sup>. Studi su modelli animali supportano questa ipotesi: il modello murino di entesopatia anchilosante manifesta un'inflammazione che conduce ad un danno anchilotico in associazione alla presenza dell'HLA-B27. Tuttavia, in maniera simile a quanto accade nell'uomo, la presenza dell'HLA-B27 non necessariamente porta allo sviluppo della malattia. Quando questi topi vengono allevati in un ambiente germ-free infatti non manifestano segni di malattia<sup>12</sup>. Questi dati indicano che l'HLA-B27 agisce come fattore predisponente alla malattia ma che quest'ultima si sviluppa solamente dopo l'esposizione ad un trigger ambientale quale, ad esempio, gli enterobatteri.

Il concetto del "peptide artritogenico" è stato successivamente messo in discussione da due studi<sup>13,14</sup>, nei quali veniva dimostrato come l'assenza delle cellule T CD8+ nel modello animale non preveniva lo svilupparsi della malattia.

Le SpA non condividono i fattori di rischio genetici delle malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide o il lupus eritematoso sistemico, ma presentano polimorfismi dei geni coinvolti nel riconoscimento dell'immunità innata (CARD9) e nelle vie di segnalazione citochinica, quali il TNF (TNFR superfamily



membrano 1A, TNF receptor type 1-associated death domain protein TRADD, TNF receptor superfamily member 15), IL-1 (IL-1A, IL1R2), IL-23/IL-17 (IL-23R, STAT3)<sup>15,16,17</sup>. Esse inoltre non presentano una prevalenza per il sesso femminile né autoanticorpi specifici di malattia. Infine, terapie mirate verso le cellule T o B, quali l'abatacept, alefacept, efalizumab, rituximab hanno dimostrato una modesta efficacia terapeutica nelle SpA, suggerendo un ruolo di minore importanza dell'immunità adattativa nella patogenesi della malattia.

Vi è una crescente evidenza del ruolo patogenetico nelle SpA svolto dalle cellule appartenenti all'immunità innata, quali i macrofagi, mastociti e neutrofili. A differenza dell'Artrite reumatoide, la sinovia dei pazienti affetti da SA, AP e uSpA è caratterizzata da un'incrementata vascolarizzazione e da un infiltrato composto da polimorfonucleati, macrofagi CD163+ e linfociti<sup>18,19</sup>. L'aumentata vascolarizzazione e la presenza di macrofagi è caratteristica di tutti i sottotipi di SpA. L'alterazione nella risposta dell'immunità innata potrebbe essere correlata alle funzioni dell'HLA-B27 non relate alla presentazione antigenica, innescate da uno stress infettivo o meccanico<sup>20</sup>. Le cellule appartenenti all'immunità innata producono la maggior parte delle citochine proinfiammatorie (TNF, IL-1, IL-23, IL-17) ed antiinfiammatorie (IL-10). Nella membrana sinoviale e nelle lesioni cutanee dei pazienti con AP è stata riscontrata la presenza del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ <sup>21</sup>. Elevate concentrazioni di TNF- $\alpha$  sono state trovate anche nelle biopsie delle articolazioni sacroiliache dei pazienti con SA<sup>22</sup>, nei campioni biotici delle articolazioni periferiche e nel liquido sinoviale dei pazienti con AP.

I primi studi immunoistologici avevano dimostrato la presenza delle cellule T e B, dei neutrofili e macrofagi (CD68+) a livello delle articolazioni sacroiliache. Oltre al ruolo del TNF- $\alpha$ , era stato riscontrato anche un incremento dell'IL-6 nelle prime fasi e del TGF- $\beta$  nelle fasi avanzate della malattia. Tuttavia, nonostante i dati istopatologici suggeriscano un ruolo cruciale dell'IL-6, i dati sperimentali non supportano il ruolo dell'inibizione dell'IL-6 nelle SpA; tale aspetto sarà definitivamente chiarito mediante l'esecuzione di futuri trial clinici<sup>23</sup>.

D'altra parte l'immunoistologia non sempre fornisce un quadro completo delle caratteristiche della flogosi: alcuni studi segnalano la presenza delle cellule B (associate solitamente alle forme autoimmuni ad alta produzione autoanticorpale)

e l'efficacia del trattamento anti-CD20 con rituximab nel gruppo di pazienti affetti da SpA naïve agli anti-TNF- $\alpha$  (con percentuali di risposta che si avvicinano a quelle dei trial con gli anti-TNF- $\alpha$ ), a differenza di una scarsa risposta nel gruppo di pazienti anti-TNF-failure<sup>24</sup>. In un trial clinico con rituximab, i pazienti inizialmente responsivi hanno mantenuto una buona risposta ad un anno di follow-up, e di questi il 50% ha effettuato un secondo ritrattamento per riacutizzazione clinica<sup>25</sup>.

Tra gli altri meccanismi patogenetici studiati, l'asse IL-23/IL-17 sembra avere un ruolo importante nelle malattie croniche immuni: l'IL-23, prodotta prevalentemente dai monociti/macrofagi, stimola la produzione dell'IL-17 da parte delle cellule Th17. Più specificatamente, il blocco dell'IL-17A si è dimostrato efficace in un trial clinico nella SA<sup>26</sup>. Nonostante lo studio dell'asse IL-23/IL-17 si sia focalizzato principalmente sulle cellule Th17, l'analisi diretta delle articolazioni assiali e periferiche di pazienti affetti da SpA ha dimostrato che l'IL-17 viene espressa anche dalle cellule appartenenti all'immunità innata (mastociti e neutrofili)<sup>27,28</sup>. Ad ulteriore conferma, l'utilizzo di imatinib (c-kit inibitore) verso i mastociti ha ridotto la produzione di IL-17 nella sinovia dei pazienti con SpA<sup>29</sup>.

Rimane, tuttavia, ancora da chiarire l'esatto ruolo delle cellule Th17, sia nella fase di transizione dall'immunità innata che nella fase cronica adattativa. In un recente lavoro di Xueyi et al<sup>30</sup> sono stati valutati gli effetti degli anti-TNF- $\alpha$  sui livelli dei linfociti Th17 e Treg circolanti e delle relative citochine seriche nei pazienti con SA: al basale i pazienti con malattia attiva presentavano valori più elevati di tali cellule e delle citochine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23 rispetto ai controlli; al 6° mese di trattamento con gli anti-TNF- $\alpha$ , nei responders si è osservato un decremento dei Th17, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23 ed un incremento delle cellule Treg e della citochina TGF- $\beta$ ; viceversa, nei non responders è stato evidenziato un incremento dei Th17, IL-17 e IL-23 ed una riduzione dei Treg.

La prevalenza delle alterazioni del comparto mieloide rispetto a quello linfoide suggerisce un'origine autoinfiammatoria piuttosto che autoimmune delle SpA, in accordo con la classificazione di McGonagle e McDermott<sup>31</sup>. Per tale motivo, una terapia mirata alle cellule dell'immunità innata o ai loro mediatori potrebbe risultare più efficace delle terapie dirette verso l'immunità adattativa.

Altri studi si sono focalizzati sul ruolo degli osteoclasti nello sviluppo delle erosioni ossee. Nei pazienti con AP è stato infatti riscontrato un incremento del numero degli osteoclasti in associazione ad alti livelli dell'attivatore del recettore del fattore nucleare kappa B (RANK) e del RANK-ligando (RANKL) nel lining sinoviale<sup>32</sup>. La presenza dei precursori circolanti degli osteoclasti è risultata significativamente maggiore nei pazienti affetti da AP con artrite erosiva rispetto ai pazienti che non presentavano erosioni articolari. Il trattamento con i farmaci anti-TNF- $\alpha$  si è dimostrato capace di ridurre il numero dei precursori degli osteoclasti nei pazienti con AP. I risultati suggeriscono che tali cellule, stimulate dal legame del RANKL al RANK, sarebbero in grado di provocare le erosioni ossee e che i farmaci anti-TNF- $\alpha$  potrebbero attenuare tale processo.

Nonostante le manifestazioni erosive possano evolvere in quadri articolari altamente destruenti, come accade in alcune forme di artrite psoriasica, l'aspetto più caratteristico delle SpA è l'osteoproliferazione, che conduce ad un danno scheletrico irreversibile mediante la formazione di sindesmofiti, entesofiti fino all'anchilosi articolare con conseguente comparsa di disabilità nei pazienti affetti. Questo è in chiaro contrasto con quanto accade nell'artrite reumatoide, dove il danno strutturale è determinato dal processo erosivo e dove gli inibitori del TNF- $\alpha$  si sono dimostrati in grado non solo di migliorare la sintomatologia articolare ma anche di ridurre la progressione del danno radiografico. Mentre nell'artrite reumatoide il danno strutturale rappresenta una conseguenza diretta dell'infiammazione, nelle SpA è meno chiara l'associazione tra il processo infiammatorio e quello osteoproliferativo. Dai dati presenti in letteratura il trattamento continuativo con FANS, rispetto all'assunzione di tali farmaci al bisogno, sembrerebbe ridurre la progressione del danno radiografico nella SA<sup>33</sup>. Non è chiaro se tale effetto dipenda dalle loro proprietà anti-infiammatorie o sia dovuto all'inibizione degli osteoblasti mediante l'azione esercitata sulle prostaglandine. Viceversa, basandosi sui dati di follow-up radiologico a 2 anni, nessuno dei tre farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  approvati per il trattamento della SA (etanercept<sup>34</sup>, infliximab<sup>35</sup> e adalimumab<sup>36</sup>) si è dimostrato in grado di modificare la progressione del danno anchilolitico.

Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari di neoformazione ossea e dell'eventuale interazione con il processo infiammatorio è cruciale per chiarire la successione di eventi nella SpA e per lo sviluppo di terapie mirate. In una recente pubblicazione è emerso il ruolo della molecola denominata Dickkopf-1 (DKK1) nella stimolazione degli osteoclasti e nella inibizione della via della Wnt/ $\beta$ -catenina, a sua volta in grado di attivare i meccanismi di osteoproliferazione mediante molecole quali l'osteoprotegerina. Diarra e collaboratori<sup>37</sup> hanno dimostrato che nel modello murino l'inibizione di DKK1 con specifici anticorpi era in grado di indurre la formazione di osteofiti e di aumentare i livelli di osteoprotegerina con conseguente blocco dell'attivazione degli osteoclasti e del danno erosivo. In questo studio il TNF- $\alpha$  è stato identificato quale induttore chiave del DKK1 nei modelli di artrite infiammatoria. Questo è probabilmente il motivo per cui il blocco del TNF- $\alpha$  è in grado di inibire il riassorbimento osseo ed allo stesso tempo di attivare la neoformazione ossea.

Recenti evidenze suggeriscono l'esistenza di una correlazione fra la via della Wnt/ $\beta$ -catenina e la via delle prostaglandine: tra gli effetti mediati dalla PGE2 vi sarebbero da un lato l'inibizione del DKK1 e della sclerostina, dall'altro la stimolazione della via Wnt<sup>38</sup>. L'osteoproliferazione mediata dalla proteina Wnt verrebbe quindi bloccata dagli inibitori delle prostaglandine quali i FANS, spiegando l'effetto inibitorio di tali farmaci sulla neoformazione dei sindesmofiti segnalata in letteratura.

### ***Ruolo del TNF $\alpha$ nelle SpA***

Il termine tumor necrosis factor (TNF) si riferisce a due citochine, codificate da geni distinti, il TNF- $\alpha$  (o cachessina) e il TNF- $\beta$  (o linfotossina)<sup>39</sup>. Il TNF- $\alpha$  agisce attraverso il legame a due recettori transmembrana, il TNFR1 (75 kDa) e il TNFR2 (55 kDa). Il TNFR1 rappresenta il principale recettore del TNF- $\alpha$  ed è espresso in tutti i tessuti umani. Il TNFR2 lega sia il TNF- $\alpha$  che il TNF- $\beta$  ed è espresso principalmente sulle cellule del sistema immunitario.

Il TNF- $\alpha$  viene sintetizzato in risposta a tossine batteriche (LPS), prodotti dell'infiammazione e altri tipi di stimoli.

Il gene del TNF- $\alpha$  è localizzato sul cromosoma 6 all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità: questa citochina viene prodotta in forma transmembrana dal peso molecolare di 26 kDa<sup>87</sup>. La forma di membrana è biologicamente attiva ed è stata implicata nelle attività paracrine del TNF. La forma solubile del TNF- $\alpha$  deriva dal suo precursore transmembrana attraverso il clivaggio enzimatico del dominio extracellulare in risposta all'LPS e ad altri stimoli. L'enzima responsabile di tale clivaggio è denominato TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE), una metalloproteasi<sup>40</sup>. La forma solubile dà origine ad un omotrimerico dal peso molecolare di 51 kDa, che rappresenta la forma bioattiva predominante nel siero e negli altri fluidi corporei.

I recettori presentano una struttura omologa con simile affinità per quanto concerne i domini extracellulari leganti il TNF $\alpha$ , mentre possiedono vie diverse di segnalazione intracellulare. L'interazione recettore-ligando porta al raggruppamento di tre recettori ad un trimero del TNF $\alpha$ . Tale interazione induce la risposta cellulare massimale senza l'internalizzazione del complesso ligando-recettore.

Le forme solubili di entrambi i tipi di recettori, denominate TNF-binding proteins (TNF-BPs), sono state riscontrate nelle urine e nel siero di pazienti con una varietà di malattie, incluse il cancro, l'AIDS e la sepsi<sup>87</sup>. Il loro ruolo biologico è controverso, poiché in alcuni casi essi inibiscono o neutralizzano l'attività del TNF $\alpha$  prevenendone l'interazione con i recettori di membrana; in altri casi, invece, possono prolungare o aumentare l'attività del TNF $\alpha$  circolante attraverso la stabilizzazione della struttura trimerica della citochina, prevenendone la clearance dal siero<sup>41,42</sup>. Probabilmente i TNF-BPs vengono rilasciati durante i periodi di eccessiva produzione citochinica per prevenire gli effetti tossici del TNF $\alpha$  e per provvedere a un pool di TNF- $\alpha$  bioattivo, che viene lentamente rilasciato durante la risposta dell'ospite.

I macrofagi attivati stimolati dall'LPS rappresentano la fonte principale del TNF- $\alpha$ . L'LPS è l'induttore più potente ed è attivo sia sui monociti che sui macrofagi. Il trattamento simultaneo con IFN- $\gamma$  rende i macrofagi attivati sensibili a quantità molto piccole di LPS ed è anche un potente amplificatore del rilascio del TNF- $\alpha$  indotto dall'LPS<sup>43</sup>. Il TNF- $\alpha$  induce la sua stessa sintesi e il rilascio dai

monociti. Esso può avvenire anche in presenza di alcune citochine quali l'IL-2, GM-CSF e CSF-1<sup>92</sup>. La sintesi del TNF- $\alpha$  viene innescata in tutti i casi per attivazione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B, che si lega al promotore sul gene del TNF- $\alpha$  e di altre citochine pro-infiammatorie<sup>44,45</sup>.

Sembra che virtualmente tutti i tipi di cellule nucleate possano rispondere al TNF- $\alpha$ , in quanto dotate di recettori<sup>92</sup>. Il TNF- $\alpha$  infatti può stimolare indirettamente il midollo osseo, attraverso il rilascio di CSF; può attivare e indurre la differenziazione dei macrofagi, indurre la degranulazione dei neutrofili e il rilascio dei leucotrieni, stimolare la proliferazione dei linfociti, il rilascio di collagenasi; può indurre i condrociti a riassorbire i proteoglicani, attivare gli osteoclasti, aumentare il catabolismo delle cellule muscolari. Come mediatore dell'infiammazione scatena il rilascio praticamente di tutti i mediatori noti, dall'IL-1 ai metaboliti dell'acido arachidonico. I suoi effetti variano dalla necrosi emorragica e dall'ARDS, alla fibrosi estesa o alla creazione di strutture quali i granulomi immunitari. Attraverso la capacità di influenzare la chemiotassi leucocitaria mediante l'induzione e l'aumentata espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali, il TNF- $\alpha$  può facilitare l'accumulo locale delle cellule che maggiormente lo producono, ovvero i macrofagi. La sua capacità di attaccare gli agenti patogeni esogeni attraverso l'induzione e l'aumento, spesso in associazione all'IFN- $\gamma$ , della produzione dei radicali dell'ossigeno e i derivati dell'ossido nitrico, è probabilmente associata alla sua capacità di ledere i tessuti dell'ospite.

L'aberrante produzione del TNF- $\alpha$  è stata chiamata in causa nella patogenesi di diverse malattie, quali l'AR, il diabete mellito insulino-dipendente, le spondiloartriti sieronegative e le malattie infiammatorie intestinali, in particolare il morbo di Crohn.

Il TNF- $\alpha$  riveste un ruolo centrale nella maggioranza dei meccanismi patologici che guidano l'infiammazione ed il danno nelle SpA. Questa citochina viene prodotta da macrofagi, monociti, mastociti, osteoclasti, cellule dendritiche e linfociti T a livello delle articolazioni e da molte delle stesse cellule in associazione alle cellule dendritiche, a quelle di Langerhans ed ai cheratinociti a livello cutaneo. A livello delle articolazioni il TNF- $\alpha$  induce la secrezione di chemochine ed incrementa l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule en-

doteliali, reclutando un numero crescente di linfociti ed altre cellule dotate di potenziale flogogeno nei siti articolari infiammati. Esso infine stimola la produzione di metalloproteinasi da parte dei fibroblasti sinoviali, condrociti e neutrofili ed attivando gli osteoclasti è causa del riassorbimento cartilagineo ed osseo<sup>46</sup>. Un recente lavoro ha dimostrato un'up-regolazione dei toll-like receptors 2 e 4 nella sinovia di pazienti con SpA, sottolineando il potenziale ruolo dell'immunità innata e la significativa down-regolazione di tali recettori conseguente al blocco del TNF- $\alpha$ <sup>47</sup>. A livello cutaneo il TNF- $\alpha$  possiede simili effetti proinfiammatori e contribuisce all'indurimento cutaneo con la formazione delle placche psoriasiche mediante la stimolazione della proliferazione ed inibizione dell'apoptosi dei cheratinociti. Diversi studi hanno dimostrato l'effettiva down-regolazione di tali processi mediante l'inibizione del TNF- $\alpha$ .

### **3.2. Classificazione e diagnosi delle Spondiloentesoartriti sieronegative**

L'ILAR (International League against Rheumatism) fu la prima a descrivere nel 1957 un gruppo di "artriti reumatoidi atipiche", comprendente la SA, l'AP e le ARe, così definite poichè non conformi al quadro di poliartrite simmetrica caratteristico dell'artrite reumatoide più che per le loro somiglianze cliniche. Solo nel corso degli anni successivi si realizzò che tali malattie, pur eterogenee, presentavano delle caratteristiche cliniche comuni, quali la predilezione per la spondilite e sacroileite, l'entesite e le manifestazioni extra-articolari quali l'uveite anteriore.

Nel 1974 Moll e Wright introdussero il termine di spondiloartriti sieronegative, sottolineando l'importanza dell'assenza del fattore reumatoide e la condivisione di quadri anatomopatologici, clinici, radiologici e genetici comuni<sup>48</sup>.

A causa delle caratteristiche che spesso si sovrappongono nelle diverse forme e poiché diversi soggetti presentano delle forme incomplete di tali malattie, l'European Spondyloarthropathy Study Group (ESSG) ha successivamente proposto dei criteri classificativi preliminari per la diagnosi delle spondiloartriti che rendono possibile la classificazione, almeno provvisoria, di forme che si possono ancora definire indifferenziate.

I criteri dell'ESSG<sup>49</sup> sono stati validati mediante studi su diverse popolazioni<sup>50,51</sup> e presentano una sensibilità del 75% ed una specificità pari all'87% (Tab.1). Amor et al.<sup>52</sup> ha proposto un set alternativo di criteri classificativi, più complesso rispetto al precedente ma di maggiore sensibilità (85%) e specificità (90%), grazie all'inserimento delle manifestazioni oculari, della dattilite e della positività per HLA-B27. E' importante ricordare che tali criteri sono stati creati a scopo classificativo e non diagnostico, risultando utili negli studi epidemiologici e nei trial clinici ma non nella pratica clinica quotidiana, dove è necessario includere pazienti negli stadi più precoci di malattia. Tale aspetto assume particolare importanza con l'avvento dei farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$ , dove la risposta al trattamento sembra essere favorita dalla durata inferiore di malattia. Il principale limite dei criteri ESSG consiste proprio nella bassa sensibilità e specificità che



hanno dimostrato se applicati nelle prime fasi di malattia, ovvero entro 12 mesi dall'esordio dei sintomi.

Con questa motivazione l'Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) ha deciso di proseguire il lavoro del gruppo ESSG per migliorare gli attuali criteri classificativi per le SpA.

Le SpA possono essere clinicamente distinte nelle forme ad impegno prevalentemente periferico o assiale, con diversi gradi di sovrapposizione tra i due sottotipi. L'obiettivo principale dello studio era la creazione di nuovi criteri classificativi per la SpA in accordo con la presentazione clinica: a) ad impegno assiale se vi era un coinvolgimento articolare prevalente a carico delle articolazioni sacroiliache e/o rachideo; b) periferico, qualora le manifestazioni principali fossero rappresentate dall'artrite periferica, entesite e/o dattilite<sup>53</sup>. Il vantaggio di tale approccio classificativo consiste in una migliore rappresentazione della malattia in fase iniziale e nel miglioramento della scelta terapeutica, differendo le strategie terapeutiche proprio in base alla forma assiale o periferica prevalente.

La sacroileite radiograficamente evidente rappresenta una parte essenziale dei criteri di New York modificati per la SA<sup>54</sup>. Tuttavia, come già anticipato, le alterazioni radiografiche riflettono le conseguenze dell'infiammazione (il danno strutturale) più che l'infiammazione in sé, la quale può invece essere evidenziata grazie all'utilizzo della risonanza magnetica nucleare (RMN). Le alterazioni visibili in RMN precedono spesso di anni la comparsa delle prime alterazioni alle articolazioni sacroiliache evidenziabili alla radiografia convenzionale<sup>55,56,57</sup>.

Per prima cosa l'ASAS si è focalizzata sullo sviluppo di nuovi criteri classificativi per la SpA ad impegno assiale<sup>58</sup>, che sono stati recentemente validati in un ampio studio multicentrico<sup>59</sup> (Tab.2). A differenza dei precedenti, i nuovi criteri classificativi oltre a comprendere pazienti che presentano una sacroileite radiologicamente evidente (e che vengono pertanto classificati nel sottogruppo della SA), permettono anche di classificare pazienti affetti da SpA assiale nella fase early (pre-radiografica) o le forme abortive di SpA, definite dalla presenza di sacroileite evidenziata alla RMN o la presenza dell'HLA-B27 in combinazione con le altre caratteristiche delle SpA. La principale novità consiste nell'inclusione della RMN tra i nuovi criteri classificativi, motivata dai vantaggi offerti da tale indagine

nell'evidenziare i segni dell'infiammazione assiale nelle forme early di malattia. I nuovi criteri classificativi ASAS per la SpA assiale si sono dimostrati superiori ai criteri di Amor ed ESSG nella diagnosi delle forme precoci di SpA assiale: presentano una sensibilità dell'82,9% ed una specificità pari all'84,4%.

Nel 2011 sono stati infine pubblicati i criteri classificativi per la SpA ad impegno periferico (Fig 1)<sup>60</sup>. Si tratta di uno studio multicentrico in cui sono stati inclusi pazienti che presentavano artrite periferica, entesite e/o dattilite, di durata inferiore ad 1 anno. Nonostante al momento dell'inclusione nello studio nessuno dei pazienti presentasse la rachialgia infiammatoria, la valutazione radiografica delle articolazioni sacroiliache ha dimostrato una sacroileite nel 19.5% dei casi, e nel 22% dei casi in cui è stata effettuata una valutazione in RMN il 44% presentava lesioni infiammatorie attive. I nuovi criteri classificativi ASAS per la SpA periferica si sono dimostrati superiori ai criteri modificati di Amor ed ESSG nella diagnosi delle forme precoci di SpA periferica, presentando una sensibilità dell'77,8% ed una specificità pari all'82,9%.

L'applicazione combinata dei criteri per la SpA assiale e periferica nell'intera popolazione delle SpA studiata dall'ASAS (975 pazienti) si è dimostrata superiore in termini di sensibilità (79,5%) e di specificità (68,8%) rispetto ai precedenti criteri modificati ESSG (sensibilità 79,1%, specificità 68,8%) e di Amor (sensibilità 67,5%, specificità 86,7%).

**Tabella 1. Criteri ESSG e di Amor per la classificazione delle Spondiloartriti sieronegative.**

	European Spondylarthropathy Study Group	Amor Criteria
Definitive diagnosis	Inflammatory spinal pain or synovitis (asymmetric or predominantly in the lower limbs), together with at least 1 of the following: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Positive family history</li> <li>• Psoriasis</li> <li>• Inflammatory bowel disease</li> <li>• Urethritis</li> <li>• Alternating buttock pain</li> <li>• Enthesopathy</li> <li>• Sacroiliitis (bilateral with a grade of 2 to 4 or unilateral with a grade of 3 to 4)</li> </ul>	Diagnosis of SpA if 6 or more points are amassed (exclusion criteria not included): <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflammatory back pain (1 point)</li> <li>• Unilateral buttock pain (1 point)</li> <li>• Alternating buttock pain (2 points)</li> <li>• Enthesitis (2 points)</li> <li>• Peripheral arthritis (2 points)</li> <li>• Dactylitis (sausage digit) (2 points)</li> <li>• Acute anterior uveitis (2 points)</li> <li>• HLA-B27 positive</li> <li>• History of SpA (2 points)</li> <li>• Good response to NSAIDs (2 points)</li> </ul>

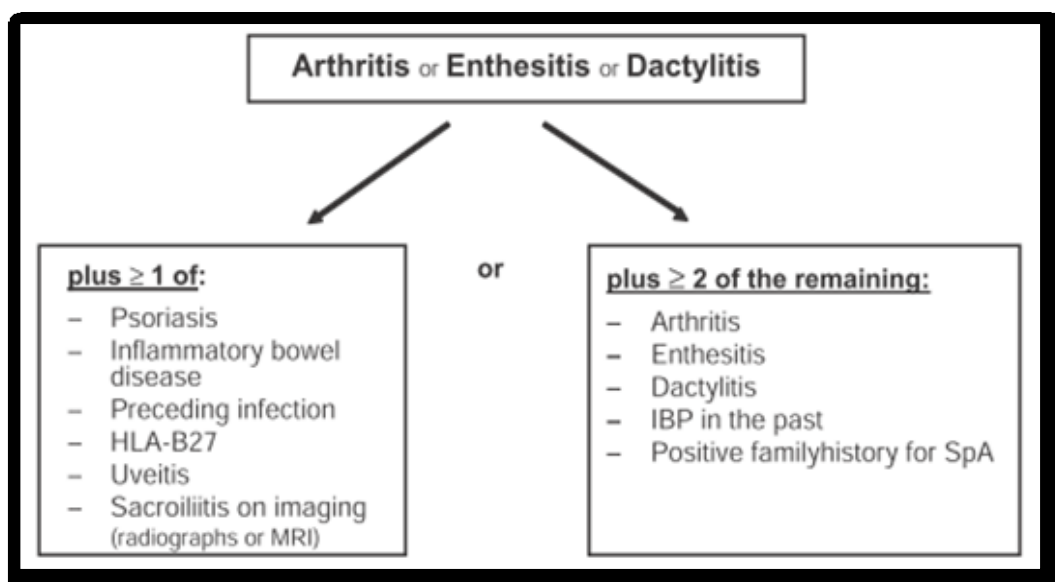
*Semin Arthritis Rheum 2008;38:83-100*

Tab 2. Criteri classificativi ASAS per la SpA assiale

ASAS classification criteria for axial spondyloarthritis (SpA) In patients with $\geq 3$ months back pain and age at onset $< 45$ years		
Sacroiliitis on imaging* plus $\geq 1$ SpA feature#	or	HLA-B27 plus $\geq 2$ other SpA features#
<div> <div>#SpA features</div> <ul style="list-style-type: none"> <li>• inflammatory back pain</li> <li>• arthritis</li> <li>• enthesitis (heel)</li> <li>• uveitis</li> <li>• dactylitis</li> <li>• psoriasis</li> <li>• Crohn's/colitis</li> <li>• good response to NSAIDs</li> <li>• family history for SpA</li> <li>• HLA-B27</li> <li>• elevated CRP</li> </ul> </div> <div> <div>*Sacroiliitis on imaging</div> <ul style="list-style-type: none"> <li>• active (acute) inflammation on MRI highly suggestive of sacroiliitis associated with SpA</li> <li>• definite radiographic sacroiliitis according to mod NY criteria</li> </ul> </div>		

*Ann Rheum Dis 2009;68:777-83*

Fig 1. Criteri classificativi per la SpA periferica



*Ann Rheum Dis 2011; 70:25-31*

### **3.2.1. La spondiloartrite indifferenziata**

La spondiloartrite indifferenziata (uSpA) rappresenta il sottotipo più comune delle SpA con una prevalenza tra lo 0,7% ed il 2%<sup>61</sup>. Un paziente è considerato affetto da uSpA se soddisfa i criteri per le SpA definiti dall'ESSG o i criteri di Amor senza rientrare in una delle forme specifiche ovvero la SA, l'AP, l'Artrite Enteropatica o l'ARe. La uSpA non presenta caratteristiche patognomiche: il dolore spinale infiammatorio, l'artrite periferica e, meno frequentemente, l'entesite rappresentano le manifestazioni cliniche principali.

Per quanto concerne il dolore spinale infiammatorio, nella definizione originale di Calin<sup>62</sup> esso si presenta in soggetti di età inferiore ai 40 anni, ha una durata superiore ai 3 mesi ed un esordio insidioso; si associa alla presenza di rigidità mattutina e si riduce con l'attività fisica. Nella uSpA il danno assiale radiograficamente evidente è di solito assente, anche se si possono osservare occasionali sindesmofiti; se numerosi o in presenza di altri segni clinici caratteristici di impegno assiale evoluto va posta diagnosi di SA. Nella uSpA la sacroileite è meno evidente rispetto alla SA, spesso perché riscontrata in una fase precoce della malattia. L'artrite periferica è tipicamente asimmetrica, coinvolgendo da 1 a 3 grandi articolazioni degli arti inferiori. Comune è l'entesite, più frequentemente all'inserzione del tendine Achilleo, della fascia plantare ed alla tuberosità tibiale. La dattilite si riscontra con minore frequenza rispetto a quanto accade nella AP e nelle ARe. Le manifestazioni extra-articolari si presentano di rado<sup>63</sup> inclusi l'impegno oculare caratterizzato dall'uveite anteriore o dalla congiuntivite (33%), il coinvolgimento mucocutaneo (16%) e le manifestazioni cardiache (8%). Come in tutte le spondiloartriti sieronegative si riscontra un'alta incidenza della positività per l'HLA-B27 la cui prevalenza stimata si aggira tra il 70% e l'84%<sup>64</sup>. Un numero significativo di pazienti non presenta un incremento degli indici di flogosi nonostante la presenza di lombalgia infiammatoria o di artrite periferica. L'imaging può essere di ausilio nella diagnosi se si riscontrano delle alterazioni caratteristiche ma una radiografia normale non esclude la presenza della malattia. Le alterazioni radiografiche a carico delle articolazioni sacroiliache sono per definizione minime e spesso unilaterali. La uSpA e la SA si differenziano

sostanzialmente per il numero di alterazioni riscontrabili: la presenza di 2 o più lesioni croniche bilaterali sacroiliache e di 2 o più sindesmofiti permette di formulare diagnosi di SA. Un precedente lavoro<sup>65</sup> sull'uso della risonanza magnetica nucleare in 111 pazienti affetti da uSpA ha confermato un'alta prevalenza di sacroileite (pari al 78%) e minore di spondilite (9%) dimostrandosi un utile strumento nella diagnosi precoce della SpA.

Le radiografie delle articolazioni periferiche sono spesso normali. Le erosioni marginali non risultano rilevanti a differenza di quanto accade nella AP. L'ecografia è una tecnica particolarmente indicata per evidenziare alterazioni periferiche superficiali quali entesiti, borsiti, tendiniti e sinoviti che spesso si associano alla uSpA. Poiché la lombalgia infiammatoria cronica è la caratteristica principale riscontrata nella uSpA e poiché quest'ultima tende spesso ad evolvere verso la forma definita di SA, recentemente è stato introdotto il concetto di SpA a prevalente impegno assiale come entità clinica separata, i cui criteri classificativi si basano sull'uso della risonanza magnetica nucleare nella fase precoce di malattia.

Generalmente si distinguono due subsets di uSpA a seconda che avvenga o meno una progressione verso la SA o altri subsets definiti di SpA. I pazienti che progrediscono verso la SA sono spesso quelli che presentano alterazioni infiammatorie assiali evidenziate sia clinicamente che mediante la RMN nelle fasi precoci di malattia. In tali pazienti la terapia precoce con farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  potrebbe non solo ridurre il grado di attività di malattia ma anche bloccare la progressione verso la SA. Oostveen e collaboratori<sup>66</sup> hanno dimostrato che dopo un follow-up di tre anni il 60% di 25 pazienti con sacroileite evidenziata alla RMN progrediva verso la forma radiologicamente definita della SA. Sampaio-Barros e collaboratori<sup>67</sup> riportano, invece, in uno studio di follow-up di due anni proporzioni più basse di progressione verso forme definite di SpA: il 10% di 68 pazienti è evoluto verso la SA, un paziente ha sviluppato l'Artrite Psoriasica mentre nel 75% dei soggetti la malattia è rimasta stabile. Appare verosimile che tale proporzione sia destinata ad aumentare nel tempo. Altri studi retrospettivi hanno riportato percentuali di progressione variabili dal 2% al 25%. Sembrerebbe più rara invece l'evoluzione verso altri sottotipi di SpA quali la forma psoriasica o quella associata alle malattie infiammatorie intestinali.

Per quanto riguarda lo studio dei fattori prognostici negativi nelle SpA, i dati attuali segnalano tra i fattori predittivi di progressione la presenza di coxite, della limitazione funzionale del rachide lombare, della dattilite, dell'oligoartrite, l'esordio in giovane età, gli elevati valori degli indici di flogosi e la scarsa risposta alla terapia con FANS<sup>68</sup>. A differenza delle SpA, nella uSpA non è chiaro quali siano i fattori predittivi di una malattia più aggressiva. La presenza di sciatica mozza è stata associata alla progressione verso una forma definita di SpA<sup>54</sup> soprattutto nei soggetti HLA-B27 positivi ma tale ipotesi necessita di ulteriori studi di conferma. Con l'introduzione dei farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  sarà necessario poter identificare i pazienti a maggior rischio di progressione che potrebbero beneficiare dell'intervento terapeutico precoce.

### **3.2.2. La spondilite anchilosante**

La spondilite anchilosante (SA) si presenta solitamente in soggetti giovani con un'età media attorno ai 26 anni. I maschi risultano colpiti in percentuale maggiore alle donne con un rapporto di 2 a 1<sup>69</sup>. Circa l'80% dei pazienti esordisce prima dei 30 anni mentre in meno del 5% dei casi i primi sintomi compaiono dopo i 45 anni. Esiste una forte correlazione fra la prevalenza del HLA-B27 e la prevalenza in Europa di tale malattia in una specifica popolazione. In generale la prevalenza della SA si aggira fra lo 0,1% e l'1,4%, mentre l'incidenza viene stimata tra 0,5 e 14 su 100.000 persone per anno. L'esordio in giovane età ed il sesso maschile si associano ad una prognosi peggiore con la comparsa di un danno strutturale più severo rispetto a quanto si osserva nelle donne.

La caratteristica clinica della SA è la comparsa di dolore associato a rigidità nella zona lombosacrale o in altre sedi del rachide. Solitamente vengono colpite per prime le articolazioni sacroiliache con la comparsa di dolore a livello presacrale e alle natiche con possibile estensione alla coscia ed al poplite fino alla metà prossimale del polpaccio definendo la cosiddetta sciatica mozza alterna o basculante per l'andamento alternato ai due lati. Solitamente il dolore e la rigidità persistono per diversi mesi, si manifestano durante il riposo notturno, risultano più

intensi al mattino, si accentuano con l'inattività e regrediscono con il movimento. Queste caratteristiche permettono di differenziare la lombalgia di origine infiammatoria rispetto ad un dolore di tipo meccanico.

Nel 15% dei casi – e tipicamente nella forma giovanile – la malattia esordisce con una monoartrite periferica agli arti inferiori.

L'infiammazione a livello spinale si può manifestare sotto forma di spondilite, spondilodiscite o spondiloartrite<sup>70</sup>. I danni strutturali derivano più dai fenomeni osteoproliferativi che non erosivi. I sindesmofiti e l'anchilosi caratterizzano la malattia e appaiono visibili sulle radiografie dopo diversi mesi e fino a molti anni dall'esordio. La ridotta densità minerale ossea può portare a quadri di osteoporosi severa con incremento del rischio di frattura. L'artrite periferica è solitamente monoarticolare od oligoarticolare e colpisce tipicamente gli arti inferiori. Il cingolo scapolare e pelvico vengono colpiti in circa il 20% dei pazienti. La presenza di coxite è un fattore prognostico sfavorevole. L'entesite oltre a colpire le classiche sedi del tendine d'Achille e la fascia plantare può essere presente anche ad altri livelli incluso il rachide.

Tra le manifestazioni extra-articolari spicca l'impegno oculare. In circa il 25% dei casi compare un'uveite anteriore, di solito più comune nel maschio. L'esordio è sempre acuto e monolaterale pur potendo colpire alternativamente entrambi gli occhi. Nel 2% dei casi è stata riportata la presenza di una fibrosi apicale polmonare, anche se risulta essere più comune una riduzione delle escursioni respiratorie per la progressiva anchilosi assiale. L'impegno cardiovascolare è più raro potendosi riscontrare nel 5% dei casi, di regola sotto forma di aortite associata all'insufficienza aortica ed al blocco atrioventricolare.

Le principali complicanze tardive sono rappresentate dalla spondilodiscite, caratterizzata dalla comparsa improvvisa di dolore al rachide dovuta ad un crollo di un disco intervertebrale associato ad osteite dei piatti vertebrali. Tale alterazione è evidenziabile alla scintigrafia ossea come aumentata captazione a livello intervertebrale, mentre solo nelle fasi più avanzate la radiografia del rachide è in grado di evidenziare una riduzione dello spazio discale con associate erosioni delle limitanti vertebrali. Altre complicazioni sono rappresentate dalle fratture secondarie all'aumentata fragilità vertebrale, dalla sublussazione atloepistrofea

che comporta la comparsa di dolore nucale, accompagnato da tremori, parestesie, iperreflessia agli arti superiori ed a disturbi della sensibilità nel territorio del trigemino. La sindrome della cauda equina determina la comparsa di alterazioni sensitivo-motorie agli arti inferiori seguite dal manifestarsi di incontinenza urinaria e fecale oppure di ritenzione urinaria a seconda dell'impegno delle radici sacrali.

I segni obiettivabili nella SA sono rappresentati dalla perdita della lordosi lombare nella fase precoce, dalla comparsa della cifosi dorsale con l'inversione della lordosi cervicale e dalla contrattura in flessione dell'anca con flessione compensatoria del ginocchio nelle fasi più tardive. Si può evocare una dolorabilità a livello delle articolazioni sacroiliache mediante la palpazione diretta delle stesse oppure per mezzo di diverse manovre semeiologiche come, ad esempio, il segno di Mennel mediante l'iperestensione del rachide lombosacrale. Nelle fasi più tardive il test di Schöber dimostra una ridotta flessione anteriore lombare mentre la misurazione della distanza mento-sterno permette di evidenziare una ridotta flesso-estensione del rachide cervicale.

A differenza delle altre malattie reumatiche, nella SpA vengono utilizzati principalmente due parametri di laboratorio: la tipizzazione per l'HLA-B27 e il dosaggio della PCR. La performance del test dell'HLA-B27 dipende dalla prevalenza dell'allele nella popolazione studiata. Non è necessario valutare i vari sottotipi dell'HLA-B27 nei soggetti di razza bianca mentre tali subanalisi vanno eseguite nei soggetti cinesi per escludere la presenza dell'HLA-B\*2706, non associato alla SA. L'incremento della VES si riscontra nell'80% dei casi in fase precoce mentre può risultare nei limiti nelle fasi tardive di malattia. Solamente il 50% dei pazienti presenta un rialzo della PCR<sup>71</sup>.

La sacroileite è considerata un punto cardine per lo sviluppo dei criteri classificativi a causa dell'alta prevalenza nei pazienti con SA. I primi criteri classificativi sviluppati nel 1961 (i Criteri di Roma<sup>72</sup>) non comprendevano l'esame radiografico delle articolazioni sacroiliache, introdotto nei successivi Criteri di New York nel 1966. All'esame radiografico i gradi I e II della sacroileite sono caratterizzati da una perdita di definizione della rima con comparsa di chiazze di atrofia calcarea, di solito nel tratto inferiore, con erosioni superficiali e sclerosi focale della corticale; nel grado III l'estensione delle erosioni nella corticale



produce l'allargamento dell'interlinea; in seguito la comparsa di sclerosi subcondrale ileale e la formazione di ponti ossei danno luogo all'iniziale oblitterazione della rima fino alla scomparsa della stessa nel grado IV causando l'anchilosi completa dell'articolazione.

Nel 1984 sono stati creati a scopo classificativo e diagnostico per la SA i Criteri di New York modificati<sup>42</sup>, che richiedono la presenza radiografica di una sacroileite di grado II bilaterale o di grado III o IV unilaterale in aggiunta ad almeno un criterio clinico (dolore lombosacrale; limitazione del rachide lombare nei due piani frontale e sagittale; riduzione dell'espansione toracica rispetto alla norma, 2,5 cm). Il limite di tali criteri consiste nel ritardo diagnostico tra l'esordio dei sintomi e la comparsa dopo diversi anni di una sacroileite radiograficamente evidente. Studi provenienti da diversi paesi hanno riportato un ritardo diagnostico per la SA di circa 7 anni<sup>73</sup>.

L'introduzione della RMN ha permesso di evidenziare la presenza di infiammazione articolare che precede la comparsa del danno strutturale cronico<sup>74</sup> ed il conseguente sviluppo di criteri classificativi per le forme pre-radiografiche di SpA ad impegno assiale. Con la RMN oltre alle lesioni croniche evidenziabili con le altre metodiche di imaging è inoltre possibile identificare delle alterazioni postinfiammatorie precoci denominate "fatty lesions" (degenerazione grassa del midollo osseo)<sup>75</sup>: tali lesioni rappresentano un precoce stadio di rimodellamento osseo ed un potenziale punto di partenza della successiva osteoproliferazione. L'attuale ricerca è volta alla dimostrazione dell'effettivo valore predittivo delle suddette lesioni riguardo alla progressione radiografica della sacroileite<sup>76</sup>.

Nello studio di Poddubnyy et al è stata valutata la progressione radiografica della sacroileite nella SpA assiale non radiografica (nr-ax-SpA) e SA: dopo 2 anni di follow-up, circa il 12% dei pazienti appartenenti alla nr-axSpA era evoluto nella forma definita di SA secondo i criteri di NY modificati; lo studio ha inoltre identificato quale principale fattore predittivo di progressione radiografica della sacroileite un'elevata concentrazione serica della PCR (OR=3,65 per nr-axSpA e 5,08 per SA;  $p<0,05$ <sup>77</sup>).

La malattia è ricchissima di immagini. L'osteite dei margini anteriori dei corpi vertebrali e l'ossificazione del legamento longitudinale anteriore provocano lo

squaring vertebrale mentre l'osteite degli angoli vertebrali anteriori causa la comparsa di erosioni denominate segno di Romanus. La sclerosi marginale secondaria all'osteite dà luogo alla comparsa di radioopacità agli angoli vertebrali definite angoli lucenti. L'individuazione dei tipici sindesmofiti è utile nella diagnosi della SA: si tratta di sottili prolungamenti verticali (solitamente bilaterali) del margine anterolaterale dei corpi vertebrali a partenza dalla giunzione discovertebrale con tendenza alla fusione a ponte dai due versanti opposti dei piatti vertebrali e vengono pertanto definiti somatomarginali. A differenza della SA, nelle altre forme assiali infiammatorie (spondiloartrite psoriasica) e non (polientesopatia iperostotante dismetabolica) si possono osservare ponti calcifici non marginali che tipicamente partono dal corpo vertebrale dirigendosi più lateralmente rispetto ai sindesmofiti, nei confronti dei quali sono anche più grossolani. Nella SA la diffusione dei sindesmofiti a tutto il rachide dà origine alla cosiddetta "colonna a canna di bambù". Il segno del binario deriva dall'ossificazione delle articolazioni interapofisarie producendo un'anchilosì bilaterale evidenziabile come due bande verticali radioopache. Quando tale processo si estende ai legamenti interspinali compare una banda radioopaca centrale detta "segno del pugnale". Le tre strisce parallele creano l'immagine del "binario a cremagliera".

Tali alterazioni si manifestano però solo tardivamente. L'uso delle sequenze STIR o l'applicazione delle sequenze T1-pesate dopo somministrazione di gadolinio in RMN permette di visualizzare l'infiammazione attiva nelle fasi precoci di malattia. L'applicazione di varie tecniche in RMN ha dimostrato che il processo patologico ha inizio con l'infiammazione dell'interfaccia osteocartilaginea. L'utilizzo della RMN total-body ha offerto l'opportunità di dimostrare la presenza di edema midollare osseo in siti multipli sia a livello assiale che periferico, anche in assenza di un corrispettivo clinico<sup>78</sup>. Poiché la parte calcifica dell'osso non è ben visualizzabile in RMN, tale metodo risulta poco utilizzabile nella ricerca di sindesmofiti<sup>79</sup>. Attualmente ci sono dati controversi riguardo al possibile ruolo predittivo delle lesioni infiammatorie attive identificate alla RMN per il successivo sviluppo di sindesmofiti<sup>80</sup>, mentre vi sono dati incoraggianti riguardo alle "fatty lesions" quali predittori del successivo danno osteoproliferativo<sup>81</sup>.

La radiografia convenzionale è attualmente più sensibile della RMN nel determinare il danno strutturale cronico<sup>82</sup>. Poiché le erosioni ossee (ad es. la sacroileite di grado II o il segno di Romanus) compaiono nelle fasi iniziali venendo mascherate successivamente dalle lesioni osteoproliferative, gli attuali metodi di scoring del danno strutturale, quali il Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index (BASRI)<sup>83</sup> e il modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score (mSASSS)<sup>84</sup>, si basano sulle misurazioni dei fenomeni di neoformazione ossea quali i sindesmofiti. Due recenti studi<sup>85,86</sup> hanno confermato quale principale predittore di progressione radiografica spinale la presenza di sindesmofiti alla valutazione basale. Poddubnyy et al ha inoltre identificato l'elevazione degli indici di flogosi (VES/PCR) ed il fumo di sigaretta come ulteriori fattori predittivi di progressione radiografica.

Rispetto alla radiografia convenzionale la TC presenta una sensibilità doppia<sup>87</sup> ed una maggiore specificità nell'evidenziare il danno strutturale ma è meno utilizzata per la maggiore esposizione alle radiazioni.

La scintigrafia si basa sul riscontro di un'aumentata captazione del radionuclide nelle aree ad incrementato turnover osseo, fornendo solo delle informazioni indirette sull'infiammazione. Diversi studi hanno proposto vari valori di cut-off per discriminare una sacroileite attiva nei pazienti affetti da SpA rispetto ai controlli, dimostrando una sensibilità compresa tra il 29% ed il 40% ed una specificità inferiore all'80%, quindi di limitata utilità diagnostica nelle forme early di malattia<sup>88</sup>. In un precedente studio prospettico su 21 pazienti con dolore infiammatorio spinale in assenza di una sacroileite radiograficamente evidente, la RMN ha evidenziato la presenza di flogosi articolare nel 95% casi mentre la scintigrafia è risultata positiva solo nella metà dei soggetti<sup>89</sup>.

Anche nelle SpA si sta diffondendo l'utilizzo dell'ecografia nella pratica clinica, in particolare per la valutazione dell'impegno periferico. Molti reports ne indicano la validità per evidenziare l'entesite anche nelle forme subcliniche, sfruttando la tecnica power Doppler per visualizzare un anomalo apporto vascolare a tale livello.

### 3.2.3. L'artrite psoriasica

L'artrite psoriasica (AP) è un'artropatia infiammatoria cronica associata alla psoriasi. Rispetto alla maggior parte delle malattie reumatiche, l'ereditarietà gioca un ruolo particolarmente importante in questa forma di SpA. Circa il 15% dei parenti di un paziente affetto manifesta l'AP, ed un ulteriore 30-45% presenta la psoriasi cutanea.

La prevalenza di AP nei pazienti con psoriasi varia dal 5-7% fino al 30% a seconda delle casistiche ambulatoriali od ospedaliere, rispettivamente. La prevalenza della psoriasi nella popolazione europea si aggira attorno all'2-3%, colpisce indifferentemente entrambi i sessi e di solito insorge nella quarta decade. Circa 1/3 dei pazienti con psoriasi presenta artrite, che colpisce quindi lo 0.3-1% della popolazione generale<sup>90</sup>. Nonostante la psoriasi preceda l'artrite nella maggior parte dei pazienti, circa il 15% presenta uno sviluppo simultaneo dell'artrite e delle manifestazioni cutanee, mentre in un altro 15% l'impegno articolare precede la comparsa di quello cutaneo<sup>91</sup>.

A causa dell'impegno articolare di tipo asimmetrico, della presenza di spondilite, delle manifestazioni extra-articolari e dell'associazione con l'HLA-B27 l'AP è stata inclusa nel gruppo delle SpA. Un recente studio multicentrico italiano<sup>92</sup> ha analizzato l'espressione della malattia in 1306 pazienti italiani. Nella maggior parte dei casi (67,7%) la psoriasi si è manifestata prima dell'esordio dell'artrite. Più raro è risultato l'inverso o un esordio simultaneo (rispettivamente nel 17,3% e nel 15% dei casi). L'interessamento articolare periferico (mono-, oligo- o poliarticolare) è stato osservato nell'88,7% dei casi mentre la presenza di spondilite è stata evidenziata nell'11,3% dei pazienti. Le entesiti periferiche sono state riportate nel 28,1% dei casi prevalendo nei pazienti con impegno assiale. Alterati valori della VES e della PCR sono stati riscontrati rispettivamente nel 52,2% e nel 52,6% dei pazienti, mentre la positività per il fattore reumatoide nel 5% dei casi.

La psoriasi è stata associata alla presenza dell'antigene HLA-Cw6, l'AP ad impegno periferico agli alleli B16, B38 e B39 e la forma spondilitica, come nella SA, al B27. Ho e collaboratori<sup>93</sup> hanno dimostrato come l'HLA-DRB1\*04, codificante le sequenze dello "shared epitope" ed implicato nella patogenesi

dell'artrite reumatoide, non sia associato all'AP. Tali osservazioni suggeriscono che diversi alleli dell'MHC operino in maniera indipendente nello sviluppo dei diversi fenotipi dell'AP. Si distinguono attualmente due vie patogenetiche: una agirebbe attraverso la funzione degli alleli dell'HLA-B B\*27 e B\*39, l'altra mediante l'HLA-Cw\*0602. Sembra che gli alleli Cw\*0602 conferiscano un fenotipo caratterizzato da manifestazioni cutanee più severe e solitamente da un intervallo più lungo (>10 anni) tra la comparsa della psoriasi cutanea e l'artrite. Nei soggetti B\*27 o B\*39 positivi, la componente muscoloscheletrica sembra manifestarsi contemporaneamente a quella cutanea.

Oltre alla predisposizione genetica, vari fattori ambientali contribuiscono all'insorgenza della psoriasi e dell'AP, tra cui lo stress psicofisico, l'assunzione di alcuni farmaci e gli agenti infettivi.

La classificazione dell'AP maggiormente accettata è quella proposta da Moll e Wright nel 1973 e prevede 5 varietà cliniche<sup>94</sup>:

1. Oligoartrite asimmetrica. E' la varietà più frequente colpendo le grosse articolazioni quali il ginocchio e/o le caviglie assieme ad una o due articolazioni interfalangee di mani e piedi, tipicamente con una distribuzione asimmetrica. Caratteristica è la dattilite, il cosiddetto dito "a salsicciotto", dovuta all'edema infiammatorio delle parti molli del dito. La psoriasi di solito consiste in alcune placche di psoriasi volgare associate o meno alla presenza di onicopatia.

2. Forma classica. Definita in tale modo poiché interessa soprattutto le articolazioni interfalangee distali (IFD), raramente colpite da artriti di altra natura. Essa può essere concomitante all'artrite di altre articolazioni caratteristiche delle altre forme di AP. In genere l'artrite delle IFD è oligoarticolare, si associa quasi sempre ad onicopatia e colpisce maggiormente il sesso maschile.

3. Forma mutilante. E' la forma più rara ed è causata da un'acrosteolisi a carico delle falangi distali, che conferisce l'aspetto delle dita "a cannocchiale".

4. Poliartrite simmetrica simil-reumatoide. Si presenta come una poliartrite simmetrica spesso indistinguibile dall'artrite reumatoide coinvolgendo le piccole articolazioni di mani e piedi, polsi, ginocchia, gomiti e caviglie. Nonostante le molte somiglianze con l'artrite reumatoide può da questa differenziarsi per una minore estensione del numero delle articolazioni colpite, per il più raro reperto del fattore

reumatoide, per il più frequente coinvolgimento delle IFD e della colonna e per la minore evolutività.

5. Spondilite. L'inserimento nella varietà spondilitica dipende dalla prevalenza delle lesioni della colonna rispetto a quelle delle altre sedi; spesso si associa alla positività per l'HLA-B27. Una sacroileite asintomatica si riscontra fino ad un terzo dei casi, di solito è asimmetrica monolaterale. Talvolta la spondilite può essere clinicamente indistinguibile dalla SA anche se da un punto di vista radiologico si differenzia per l'asimmetria dei ponti calcifici marginali, spesso associati alla presenza di ponti calcifici grossolani non somatomarginali. Il coinvolgimento del rachide cervicale occorre più frequentemente nei casi in cui la psoriasi è diffusa al cuoio capelluto.

Nel corso degli anni successivi sono state proposte numerose modifiche dei criteri originali di Moll e Wright con il fine di migliorarne la sensibilità e specificità<sup>95</sup>. Il gruppo CASPAR (CIASsification criteria for Psoriatic ARthritis) ha recentemente pubblicato uno studio prospettico internazionale che ha coinvolto 588 pazienti affetti da AP e 536 controlli con artrite infiammatoria<sup>96</sup>. I dati raccolti sono stati utilizzati per confrontare la performance degli esistenti criteri classificativi per la diagnosi di AP (Moll e Wright, Bennett<sup>97</sup>, Gladman et al<sup>98</sup>, Vasey- Espinoza<sup>99</sup>, ESSG, McGonagle et al<sup>100</sup>): la specificità è risultata elevata per ogni set di criteri (pari o superiore al 91%). La sensibilità del metodo di Vasey-Espinoza (0.97) è risultata simile a quella del metodo di McGonagle (0.98) e maggiore rispetto al metodo di Bennett (0.44), ai criteri di Moll e Wright (0.91), dell'ESSG (0.74) o di Gladman (0.91). Le analisi eseguite indicano che certe caratteristiche cliniche dell'AP, in particolare la psoriasi cutanea (intesa come presenza di lesioni psoriasiche o di storia personale o familiare), la dattilite, la neoapposizione ossea iuxta-articolare, l'onicopatìa ungueale così come la negatività per il FR sono altamente discriminanti per la diagnosi di AP. Basandosi sui dati raccolti in questo studio il gruppo CASPAR ha recentemente proposto un nuovo set di criteri classificativi per l'AP che include caratteristiche sia cliniche che radiologiche, ottenendo una sensibilità del 98.7% e una specificità pari al 91.4% (Tab. 3).

**Tabella 3. Criteri classificativi di Moll e Wright e CASPAR per l'AP.**

Moll and Wright Classification of Psoriatic Arthritis	CASPAR Classification Criteria for Psoriatic Arthritis
Psoriasis with <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflammatory arthritis (peripheral arthritis and/or spondylitis)</li> <li>• Negative for RF (usually)</li> </ul> Five clinical subsets: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligoarticular</li> <li>• Polyarticular</li> <li>• DIP predominant</li> <li>• Spine predominant</li> <li>• Arthritis mutilans</li> </ul>	Established inflammatory musculoskeletal disease (joint, spine, or enthesal) with 3 or more of the following: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Psoriasis* (current, history, or family history)</li> <li>• Nail changes</li> <li>• Negative test for RF</li> <li>• Dactylitis (current or history)</li> <li>• Radiological evidence of juxta-articular new bone formation</li> </ul> Current psoriasis assigned a score of 2; all other features assigned a score of 1*

*Semin Arthritis Rheum 2008;38:83-100*

Le caratteristiche radiologiche classiche dell'AP includono l'osteoproliferazione a livello delle entesi, l'osteolisi, la sacroileite, spesso asimmetrica, e la classica deformità "pencil in cup" derivante da una combinazione di processi osteolitici (che determinano l'appuntimento della falange sottostante) e osteoproliferativi (con espansione a coppa della base della falange soprastante). Tuttavia le manifestazioni radiologiche nell'AP sono spesso minime o aspecifiche. E' stata osservata un'insorgenza più lenta e una minore frequenza delle erosioni nell'AP rispetto all'artrite reumatoide<sup>101</sup>. La radiografia convenzionale indica una differenza nei meccanismi patogenetici tra l'AP e l'artrite reumatoide per l'assenza, in quest'ultima, di fenomeni osteoproliferativi. L'utilizzo dell'ecografia e della RMN ha ulteriormente migliorato le conoscenze attuali dei meccanismi patogenetici. Mediante la valutazione ecografica è stato dimostrato che sia l'artrite che la tenosinovite contribuiscono al manifestarsi della dattilite; le indagini in RMN hanno sottolineato l'importanza dell'entesite associata all'edema osseo midollare nelle fasi iniziali di malattia, riconsiderando la sinovite non come primum movens ma come processo infiammatorio secondario all'entesite.

### **3.3. Linee guida e criteri di risposta nelle SpA**

La terapia con anti-TNF- $\alpha$  ha permesso di ridurre in maniera rilevante l'attività di malattia e di migliorare la funzione e la qualità di vita dei pazienti con SpA.

L'ASAS working group e l'EULAR task force hanno recentemente aggiornato le raccomandazioni per la gestione della SA precedentemente pubblicate<sup>102,103</sup>. Tali raccomandazioni vanno applicate ai pazienti che soddisfano i criteri di NY modificati per la classificazione della SA, indipendentemente dalla presenza o meno di manifestazioni extra-articolari. I principi generali riguardanti la gestione dei pazienti con SA sono i seguenti: 1) la SA è una patologia potenzialmente severa e necessita un trattamento multidisciplinare coordinato dal reumatologo; 2) l'obiettivo principale del trattamento è quello di massimizzare nel lungo termine la qualità di vita attraverso il controllo dei sintomi e dell'infiammazione, la prevenzione del progressivo danno strutturale, la preservazione/normalizzazione della funzione e della partecipazione sociale; 3) il trattamento della SA dovrebbe puntare alla cura ottimale condivisa dal paziente e reumatologo; 4) la gestione ottimale del paziente con SA richiede una modalità combinata di trattamento farmacologico e non farmacologico.

Si riportano di seguito le 11 raccomandazioni aggiornate: il trattamento della spondilite anchilosante dovrebbe tenere conto del tipo di manifestazioni, della severità dei sintomi, dei fattori prognostici e dello stato clinico generale; il monitoraggio dei pazienti dovrebbe includere la storia clinica con le sue manifestazioni, i dati di laboratorio e radiologici, mentre la frequenza del monitoraggio dovrebbe essere decisa individualmente in base ai sintomi, alla severità ed al tipo di farmaco utilizzato. Il trattamento non farmacologico consta nell'educazione del paziente e nella regolarità dell'esercizio, sia a domicilio oppure mediante supervisione fisioterapica. Le manifestazioni extra-articolari cutanee (psoriasi), oculari (uveite) ed intestinali (MICI) dovrebbero essere gestite in collaborazione con i rispettivi specialisti; attenzione inoltre va posta all'aumentato rischio cardiovascolare ed osteoporotico. I FANS rimangono il trattamento di prima



linea per la cura del dolore e rigidità; gli analgesici quali il paracetamolo andrebbero utilizzati successivamente per alleviare il dolore residuo. Vi sono indicazioni all'utilizzo locale intra-articolare dei glucocorticoidi, mentre non vi sono evidenze scientifiche a favore della loro efficacia sull'impegno assiale. Parimenti, non è stata dimostrata l'efficacia dei DMARDs nell'impegno assiale, mentre si può prendere in considerazione l'utilizzo della sulfasalazina per l'artrite periferica. La terapia con gli inibitori del TNF- $\alpha$  dovrebbe essere iniziata nei pazienti che hanno fallito le terapie tradizionali in accordo alle recenti raccomandazioni del gruppo ASAS; non c'è indicazione all'uso obbligatorio di un DMARD in concomitanza all'anti-TNF- $\alpha$  nelle manifestazioni assiali; non c'è evidenza a supporto di una differente efficacia dei vari anti-TNF- $\alpha$  sulle manifestazioni assiali, articolari ed entesiche, mentre bisogna tenere conto della differente efficacia dei farmaci nelle IBD. Lo switch ad un secondo anti-TNF- $\alpha$  è indicato in caso di perdita di risposta al primo biologico. L'artroprotesi andrebbe considerata nei pazienti che presentano un danno radiografico avanzato a livello dell'articolazione coxo-femorale associato ad un dolore refrattario alla terapia con un'importante disabilità funzionale; l'osteotomia spinale correttiva andrebbe considerata in caso di disabilità severa legata alle deformità. In caso di frattura vertebrale andrebbe consultato il chirurgo vertebro-midollare. Nel caso di una significativa modificazione del decorso clinico andrebbero sempre indagate altre eziologie oltre alla riacutizzazione dell'infiammazione.

Il gruppo ASAS aveva pubblicato le prime raccomandazioni sull'utilizzo degli anti-TNF- $\alpha$  nei pazienti con SA nel 2003<sup>104</sup>, aggiornandole nel 2006<sup>105</sup>. Contengono indicazioni riguardanti l'avvio, il monitoraggio e la cessazione della terapia biologica.

Al momento della creazione di tali raccomandazioni erano disponibili in letteratura dati riguardanti solamente i pazienti affetti da SA che soddisfacevano i criteri di New York modificati. Alla luce dei nuovi criteri ASAS per la SpA assiale e dei recenti risultati indicanti una pari efficacia degli anti-TNF- $\alpha$  nel trattamento della SpA assiale in fase pre-radiografica, nel 2010 è stata effettuata la revisione di tali indicazioni per l'estensione dell'uso dei biologici alle forme early della SpA

assiale<sup>106</sup>. Le principali differenze tra le raccomandazioni del 2006 e 2010 sono riportate nella Fig 2.

**Figura 2: Raccomandazioni ASAS per l'utilizzo degli anti-TNF del 2006 e 2010 a confronto**

Comparison of first and second update of recommendations; changes highlighted in <i>italic bold</i>	
2006 Update recommendations	2010 Update recommendations
<b>Diagnosis</b>	<b>Diagnosis</b>
Patients normally fulfilling modified New York criteria for definitive ankylosing spondylitis	Patients fulfilling modified New York criteria for definitive ankylosing spondylitis <i>or the ASAS criteria for axial SpA</i>
<b>Active disease</b>	<b>Active disease</b>
Active disease for $\geq 4$ weeks BASDAI $\geq 4$ (0–10) and positive expert opinion	Active disease for $\geq 4$ weeks BASDAI $\geq 4$ (0–10) and positive expert opinion
<b>Treatment failure</b>	<b>Treatment failure</b>
<b>All patients:</b> should have had adequate therapeutic trials of at least two NSAIDs; defined as for at least 3 months at maximum recommended dose unless contraindicated; <3 months in cases of intolerance, toxicity	<b>All patients:</b> should have had adequate therapeutic trial of at least two NSAIDs; <i>defined as at least two NSAIDs over a 4-week period</i> in total at maximum recommended dose unless contraindicated;
<b>Axial disease:</b> no pretreatment with DMARDs required	<b>Axial disease:</b> no pretreatment with DMARDs required
<b>Peripheral arthritis:</b> one local corticosteroid injection if appropriate; therapeutic trial of sulfasalazine (4 months maximum tolerated dose) mandatory	<b>Peripheral arthritis:</b> one local corticosteroid injection if appropriate; <i>should normally have had a therapeutic trial of a DMARD, preferably sulfasalazine</i>
<b>Enthesitis:</b> appropriate local treatment	<b>Enthesitis:</b> appropriate local treatment
<b>Contraindications</b>	<b>Contraindications</b>
List of contraindications	<i>Refer to annually updated consensus statement on biological agents</i>
<b>Assessment of disease</b>	<b>Assessment of disease</b>
ASAS core set for daily practice and BASDAI	ASAS core set for daily practice and BASDAI
<b>Assessment of response</b>	<b>Assessment of response</b>
50% Improvement in BASDAI or absolute change of 2 (0–10) and positive expert opinion in favour of continuation Assessment between 6 and 12 weeks	50% Improvement in BASDAI or absolute change of 2 (0–10) and positive expert opinion in favour of continuation <i>Assessment after at least 12 weeks</i>

*Ann Rheum Dis 2011;70:905–908*

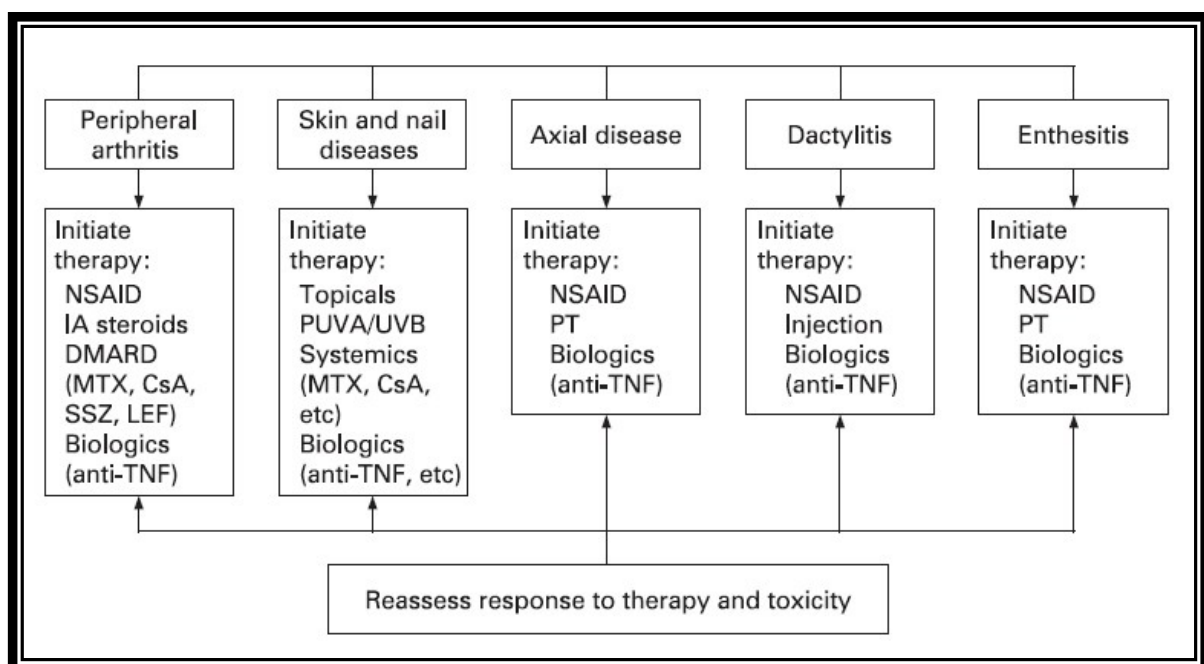
In base alle nuove indicazioni, inoltre, l'inadeguata risposta ai FANS viene definita dall'inefficacia (o non tollerabilità) ad almeno 2 FANS in un periodo di 4 settimane; il pre-trattamento con la sulfasalazina per i pazienti con manifestazioni periferiche non è più obbligatorio, anche se sarebbe preferibile effettuare un tentativo con un DMARD. I pazienti con impegno esclusivamente assiale non necessitano di trattamento con DMARD prima dell'avvio del farmaco biologico. La valutazione della risposta è rimasta immodificata (miglioramento  $\geq 50\%$  del BASDAI o  $\geq 2$  unità).

L'ASAS working group ha raccomandato un core set di parametri di valutazione utilizzabili nelle ricerche cliniche della SA, comprendenti la valutazione globale del paziente, del dolore e della rigidità mattutina, della mobilità spinale, valutazione della funzione mediante il questionario BASFI e dell'attività di malattia con l'indice BASDAI, il numero delle articolazioni tumefatte e gli indici di flogosi. Utilizzando tali parametri ha successivamente creato degli specifici criteri di

risposta compositi<sup>107</sup>, denominati ASAS20, ASAS40 e ASAS5/6, che sono stati ampiamente validati negli studi sui farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$ .

Negli ultimi anni varie organizzazioni (BSR, EULAR, GRAPPA) hanno proposto degli algoritmi terapeutici per l'AP. Più specificatamente, nel 2009 il gruppo GRAPPA ha pubblicato le prime linee guida dell'AP basate su un approccio fenotipo-specifico<sup>108</sup> (Fig. 3). L'algoritmo prevede la classificazione della malattia in lieve, moderata, severa considerando i seguenti parametri: artrite periferica, psoriasi cutanea, impegno assiale, entesite e dattilite. Le decisioni terapeutiche vengono intraprese sulla base della manifestazione clinica più severa.

**Figura 3. Linee guida GRAPPA per il trattamento dell'artrite psoriasica.**



Legenda: Anti-TNF, anti-tumour necrosis factor; CsA, ciclosporin A; DMARD, disease-modifying antirheumatic drug; IA, intra-articular; LEF, leflunomide; MTX, methotrexate; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; PT, physiotherapy; PUVA, psoralen-ultraviolet light A; SSZ, sulfasalazine; UVB, ultraviolet light B. (*Ann Rheum Dis* 2009;68:1387-1394)

Nell'impegno articolare periferico le valutazioni basali dovrebbero includere i domini definiti all'VIII<sup>a</sup> Conferenza OMERACT nel 2006<sup>109</sup>, che comprendono la conta articolare (con la valutazione di 68 articolazioni per la dolorabilità, 66 per la tumefazione), la valutazione del dolore, dell'attività di malattia del paziente (mediante scale visuoanalogiche), della funzione (ad esempio con il questionario

HAQ), della qualità di vita, dell'astenia, ed infine il dosaggio degli indici di flogosi (VES e PCR). I fattori prognostici sfavorevoli riguardanti la progressione della malattia articolare periferica nei pazienti con AP includono un numero elevato di articolazioni infiammate, alti valori di VES, il fallimento di precedenti terapie, l'evidenza clinica o radiologica della presenza di danno irreversibile, la perdita di funzione stimata mediante il questionario HAQ, la riduzione della qualità di vita indicata dai questionari SF-36, DLQI o PsAQoL. Un paziente dovrebbe essere considerato refrattario alla terapia quando essa sia stata effettuata per un periodo di tempo congruo al profilo farmacocinetico/farmacodinamico dell'agente utilizzato ed alle dosi appropriate senza evidenza di miglioramento clinico. La risposta alla terapia dell'artrite periferica nell'AP andrebbe valutata con l'utilizzo dei criteri inizialmente sviluppati per l'artrite reumatoide, quali i criteri di risposta EULAR. Essi utilizzano quale indice composito di attività di malattia il 28-joint Disease Activity Score (DAS28), che è stato validato anche per l'AP nonostante effettui la conta articolare solamente su 28 articolazioni. La risposta dovrebbe essere considerata inadeguata se c'è un'evidenza di progressione radiografica del danno articolare.

Le raccomandazioni riguardanti la terapia dell'artrite periferica includono l'utilizzo di FANS, delle iniezioni intra-articolari di glucocorticoidi, i DMARDs e gli inibitori del anti-TNF- $\alpha$ . Gli steroidi per uso sistemico non sono raccomandati nel trattamento dell'artrite psoriasica a causa della potenziale riacutizzazione della psoriasi cutanea alla sospensione del farmaco. I sali d'oro, la cloroquina e l'idrossicloroquina non sono raccomandati per il trattamento dell'AP. E' stato ipotizzato ma non dimostrato che i DMARDs siano in grado di ridurre o prevenire il danno articolare nell'AP preservando l'integrità e la funzione articolare. Molti sono i fattori che possono influenzare la scelta del DMARD nel singolo caso: il profilo di efficacia, la necessità di un monitoraggio più o meno stretto, i costi sia diretti che indiretti, la frequenza e la gravità degli effetti collaterali. Un paziente dovrebbe essere considerato un DMARD-failure quando non risponde ad almeno un DMARD in monoterapia o in combinazione per un periodo di trattamento pari o superiore ai tre mesi di cui due effettuati a dosaggio terapeutico. La terapia di

combinazione può essere provata quando un paziente non risponde al DMARD in monoterapia o presenta una progressione del danno articolare.

Per quanto concerne l'impegno assiale, esso viene definito in base alla presenza di 2 dei 3 seguenti criteri: 1) il dolore spinale infiammatorio (caratterizzato da un'età di insorgenza inferiore ai 45 anni, durata dei sintomi superiore ai 3 mesi, rigidità mattutina superiore ai 30 minuti, l'esordio insidioso, il miglioramento dopo l'esercizio, la presenza di sciatica mozza alterna); 2) la limitazione dei movimenti del rachide cervicale, dorsale o lombare (a tale proposito si segnala che a differenza della SA il paziente presenta minore dolore e limitazione funzionale ma maggiore asimmetria); 3) il criterio radiologico<sup>110</sup> (presenza di sacroileite unilaterale di grado  $\geq 2$ , sindesmofiti, lesioni alla RMN). Basandosi sull'esperienza nella SA, l'attività di malattia a livello spinale può essere correttamente misurata mediante il questionario BASDAI. Nella tabella 4 sono rappresentati i criteri che suddividono l'AP in tre categorie in base al grado di severità dell'artrite periferica, dell'impegno cutaneo, assiale, entesitico.

**Tabella 4. Suddivisione dell'artrite psoriasica in base al grado di severità di malattia.**

	Mild	Moderate	Severe
Peripheral arthritis	<5 joints No damage on x ray No LOF QoL minimal impact Pt. evaluation mild	$\geq 5$ joints (S or T) Damage on x ray IR to mild Rx Mod LOF Mod impact on QoL Pt. evaluation moderate	$\geq 5$ joints (S or T) Severe damage on x ray IR to mild-moderate Rx Severe LOF Severe impact on QoL Pt. evaluation severe
Skin disease	BSA<5, PASI<5, asymptomatic *	Non-response to topicals, DLQI, PASI<10 <sup>†</sup>	BSA>10, DLQI>10 PASI>10
Spinal disease	Mild pain No loss of function	Loss of function or BASDAI>4 <sup>†</sup>	Failure of response
Enthesitis	1-2 sites No loss of function	>2 sites or loss of function	Loss of function or >2 sites and failure of response
Dactylitis	Pain absent to mild Normal function	Erosive disease or functional loss	Failure of response

Legenda: S, swollen; T, tender; LOF, loss of physical function; IR, inadequate response; BSA, body surface area; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disability Activity Index; PASI, PsoriasisActivity Severity Score; QoL, quality of life; DLQI, Dermatology Life Quality Index. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1387-1394.

Più recentemente l'EULAR task force ha pubblicato le raccomandazioni sulla gestione dell'AP<sup>111</sup>, composte da 5 principi generali, 10 raccomandazioni specifiche e da un algoritmo terapeutico (Fig. 4 e 5). Nei principi generali sono stati inclusi il riconoscimento dell'eterogeneità della malattia e la necessità di una collaborazione diagnostico-terapeutica tra il reumatologo ed il dermatologo. Le raccomandazioni terapeutiche si diversificano in base al fenotipo clinico (artrite periferica, impegno assiale, manifestazioni extra-articolari) e le comorbidità.

**Figura 4. Raccomandazioni EULAR sulla gestione dell'artrite psoriasica**

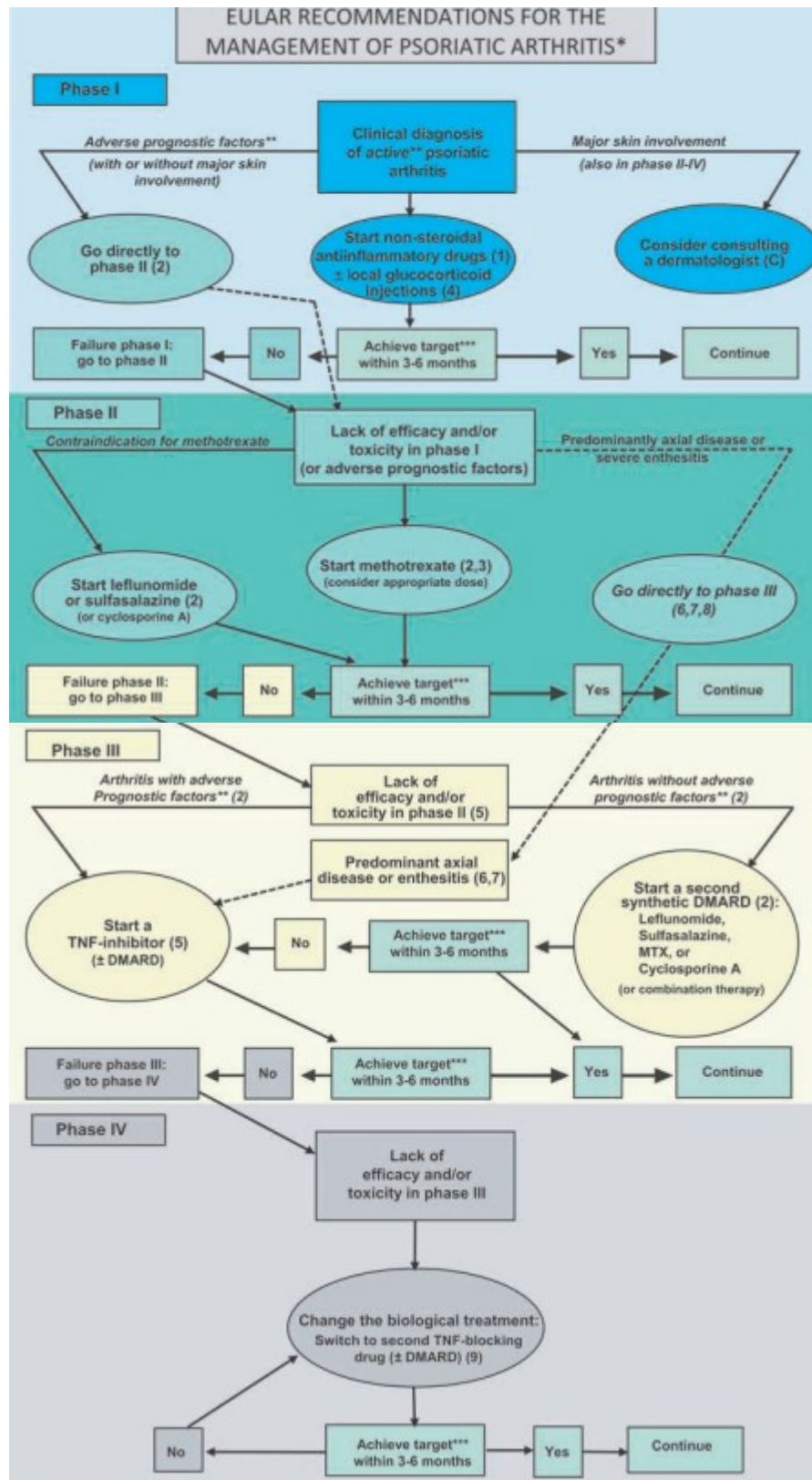
**Overarching principles**

- A. Psoriatic arthritis is a heterogeneous and potentially severe disease, which may require multidisciplinary treatment.
- B. Treatment of psoriatic arthritis patients should aim at the best care and must be based on a shared decision between the patient and the rheumatologist.
- C. Rheumatologists are the specialists who should primarily care for the musculoskeletal manifestations of patients with psoriatic arthritis; in the presence of clinically significant skin involvement, a rheumatologist and a dermatologist should collaborate in diagnosis and management.
- D. The primary goal of treating patients with psoriatic arthritis is to maximize long-term health-related quality of life through control of symptoms, prevention of structural damage, normalization of function and social participation; abrogation of inflammation, targeted at remission, is an important component to achieve these goals.
- E. Patients should be regularly monitored and treatment should be adjusted appropriately.

**Recommendations**

1. In patients with psoriatic arthritis, nonsteroidal anti-inflammatory drugs may be used to relieve musculoskeletal signs and symptoms. (1b A)
2. In patients with active disease (particularly those with many swollen joints, structural damage in the presence of inflammation, high ESR/CRP and/or clinically relevant extraarticular manifestations), treatment with disease-modifying drugs, such as methotrexate, sulfasalazine, and leflunomide, should be considered at an early stage. (1b, B)
3. In patients with active psoriatic arthritis and clinically relevant psoriasis, a disease-modifying drug that also improves psoriasis, such as methotrexate, should be preferred. (1b A)
4. Local injections of corticosteroids should be considered as adjunctive therapy in psoriatic arthritis; systemic steroids at the lowest effective dose may be used with caution. (3b, C)
5. In patients with active arthritis and an inadequate response to at least one synthetic disease-modifying antirheumatic drug, such as methotrexate, therapy with a tumor necrosis factor inhibitor should be commenced. (1b B)
6. In patients with active enthesitis and/or dactylitis and insufficient response to nonsteroidal anti-inflammatory drugs or local steroid injections, tumor necrosis factor inhibitors may be considered. (1b B)
7. In patients with predominantly axial disease that is active and has insufficient response to nonsteroidal anti-inflammatory drugs, tumor necrosis factor inhibitors should be considered. (2b C)
8. Tumor necrosis factor inhibitor therapy might exceptionally be considered for a very active patient naive of disease-modifying treatment (particularly those with many swollen joints, structural damage in the presence of inflammation, and/or clinically relevant extra-articular manifestations, especially extensive skin involvement). (4 D)
9. In patients who fail to respond adequately to 1 tumor necrosis factor inhibitor, switching to another tumor necrosis factor inhibitor agent should be considered. (2b B)
10. When adjusting therapy, factors apart from disease activity, such as comorbidities and safety issues, should be taken into account. (4 D)

Figura 5. Raccomandazioni EULAR per la gestione dell'artrite psoriasica.



Le linee guida GRAPPA ed EULAR non sono specifiche per il trattamento delle forme precoci di AP, riflettendo la relativa carenza di trial clinici in tale area<sup>112</sup>. I fattori di rischio per la progressione del danno articolare comprendono un'elevata VES, un alto numero di articolazioni coinvolte, la perdita di funzione, presenza di danno radiografico, ridotta qualità di vita<sup>113</sup>. Nei pazienti con tali fattori prognostici negativi sarebbe auspicabile un intervento precoce al fine di minimizzare la progressione del danno articolare.

Sarebbe importante inoltre definire la soglia di attività di malattia quale obiettivo terapeutico: in tal senso il concetto di minima attività di malattia (MDA, minimal disease activity, che comprende sia la fase di remissione che di bassa attività di malattia) rappresenta uno stato di malattia accettabile sia per il paziente che per il medico. Recentemente sono stati sviluppati i criteri per la MDA nella AP<sup>114</sup>: il paziente rientra nella MDA se soddisfa almeno 5 dei seguenti 7 criteri: 1)  $\leq 1$  articolazioni dolorabili; 2)  $\leq 1$  articolazioni tumefatte; 3) PASI  $\leq 1$ ; 4) VAS paziente  $\leq 15$ ; 5) VAS attività malattia paziente  $\leq 20$ ; 6) HAQ  $\leq 0,5$ ; 7)  $\leq 1$  entesi dolorabili. La successiva valutazione della performance di tali criteri nell'ambito del trial IMPACT ha confermato la validità di tale strumento dimostrando una riduzione della progressione radiografica nel sottogruppo di pazienti che avevano raggiunto la MDA<sup>115</sup>.



### **3.4. La terapia delle Spondiloartriti sieronegative**

Data l'eterogeneità dei sintomi presenti nelle diverse forme di SpA, la terapia si fonda necessariamente sull'utilizzo di diverse strategie terapeutiche a seconda delle manifestazioni cliniche prevalenti. Molti dei trial clinici pubblicati si sono focalizzati su pazienti affetti da SA o AP con pochi studi di tipo prospettico comparativo. A complicare ulteriormente le cose è la varietà delle misure di outcome utilizzate nei diversi trial che ne rende difficoltosa la comparazione.

Il trattamento migliore combina metodi non farmacologici a terapie farmacologiche, includendo la terapia fisica ed occupazionale del paziente.

I trattamenti non-farmacologici tradizionali vengono considerati fondamentali soprattutto nella SA. Tuttavia, gli studi controllati randomizzati pubblicati in tale campo sono scarsi, rendendo così difficile l'identificazione della migliore strategia terapeutica. A causa del dolore e dell'astenia associata alla SA molti pazienti non riescono a completare il programma di esercizi.

In un recente studio preliminare avevamo dimostrato l'efficacia di un programma standardizzato di esercizi ad elevato impatto aerobico in un gruppo di pazienti con SA stabilizzata con gli anti-TNF- $\alpha$ . Il trattamento con farmaci biologici, riducendo l'attività di malattia e stabilizzandola nel lungo termine, aveva permesso ai pazienti di svolgere in maniera costante un trattamento aerobico, cosa solitamente impossibile nei pazienti con malattia attiva, apportando un ulteriore beneficio in termini di riduzione del BASDAI, BASFI e del dolore valutato mediante scala visuoanalogica<sup>116</sup>.

Gli esercizi specifici per le SpA in associazione al trattamento farmacologico e la terapia fisica di gruppo settimanale hanno dimostrato una migliore risposta clinica con una maggiore riduzione dei costi rispetto al solo trattamento standard di tipo farmacologico<sup>117</sup>.

### 3.4.1. Trattamenti farmacologici convenzionali

I farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) rappresentano la terapia di prima linea per l'impegno assiale della SpA. Nonostante l'evidenza di alte percentuali di risposta per quanto concerne il dolore spinale infiammatorio, circa il 50% dei pazienti con esordio precoce continua a presentare una malattia attiva<sup>118</sup>. Benché possano essere utili nella terapia a breve termine il loro utilizzo a lungo termine spesso non è possibile a causa degli effetti collaterali, soprattutto a carico dell'apparato gastrointestinale e cardiovascolare.

I Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) trovano indicazione nel trattamento dell'artrite periferica e nel trattamento della psoriasi cutanea. Riguardo alla prima i farmaci di questa classe più comunemente utilizzati nelle SpA sono il methotrexate (MTX) e la sulfasalazina (SSZ), la ciclosporina (CsA) e la leflunomide (LEF). E' oramai nota l'inefficacia dei DMARDs nel trattamento delle manifestazioni assiali, entesitiche e della dattilite<sup>119,120</sup>.

In un gruppo di pazienti affetti da SA, AP e ARe<sup>121</sup> l'utilizzo della SSZ ha dimostrato un significativo miglioramento a sei mesi dell'impegno periferico poliarticolare. Clegg e collaboratori<sup>122</sup> hanno confermato un'efficacia clinica della SSZ sull'impegno articolare periferico ma non nel coinvolgimento assiale.

*Artrite psoriasica.* Nel trattamento dell'AP sono stati testati vari DMARDs comunemente utilizzati nell'artrite reumatoide quali il MTX, la ciclosporina e la SSZ. In una meta-analisi della Cochrane coll. tra i vari DMARDs analizzati sono risultati efficaci nella terapia dell'AP solamente il MTX a dosi maggiori rispetto a quanto utilizzato nella pratica clinica e la SSZ<sup>123</sup>. Clegg e collaboratori hanno effettuato il maggiore studio sull'uso della SSZ nell'AP<sup>124</sup>: in una casistica comprendente 221 pazienti sono stati somministrati 2 grammi al dì di SSZ con un periodo di follow-up di 36 settimane. Utilizzando lo PsARC come parametro di risposta, il 58% dei pazienti del gruppo trattato è risultato responsivo rispetto al 45% del gruppo placebo (P=0.05).

Il lavoro di Kane e collaboratori su 10 pazienti con AP ha dimostrato un significativo miglioramento dell'artrite con l'utilizzo del MTX<sup>125</sup>. L'esame istologico

sinoviale ha indicato, dopo 3 mesi di trattamento, una riduzione delle cellule T e delle molecole di adesione nel sublining e la riduzione dello spessore del lining sinoviale. In un precedente studio controllato<sup>126</sup> il MTX è risultato efficace nel ridurre l'area di superficie cutanea coinvolta nei pazienti con AP senza però dimostrare un miglioramento degli indici articolari. Va comunque segnalato che in questo lavoro il numero di pazienti era molto piccolo e sono state utilizzate dosi di MTX inferiori a quelle usuali.

Sia la ciclosporina (CyA) che la leflunomide (LEF) si sono dimostrate efficaci nel ridurre i sintomi dell'AP. Rispetto alla SSZ la CyA sembra essere più efficace nella riduzione delle artralgie. Nello studio di Kaltwasser è stato dimostrato un significativo miglioramento sia nelle manifestazioni cutanee che articolari dell'AP con l'utilizzo della leflunomide<sup>127</sup>: in base allo PsARC ha risposto il 59% dei pazienti trattati verso il 30% dei placebo ( $P < 0.0001$ ). Nel 30% dei pazienti trattati si è osservata una riduzione pari o superiore al 50% del PASI rispetto al 19% dei placebo ( $P = 0.050$ ).

### **3.4.2. Gli inibitori del TNF- $\alpha$**

Nell'ultimo decennio si è osservato un crescente utilizzo dei farmaci biologici nelle malattie reumatiche quali l'artrite reumatoide con effetti sorprendenti sull'efficacia clinica e la progressione della malattia. Il razionale dell'utilizzo degli inibitori del TNF- $\alpha$  si basa sugli effetti proinfiammatori di tale citochina, implicata nella patogenesi di numerose malattie autoimmuni, quali le SpA, la psoriasi, l'artrite reumatoide, le malattie infiammatorie intestinali.

La scoperta dell'mRNA del TNF- $\alpha$  nelle articolazioni sacroiliache infiammate dei pazienti con SA ha condotto al successivo uso degli inibitori del TNF- $\alpha$  nella terapia della SpA.

Attualmente esistono quattro inibitori del TNF- $\alpha$  disponibili per il trattamento della SpA:

- infliximab, un anticorpo monoclonale di tipo IgG1, costituito da una chimera di regioni costanti di origine umana e variabili di origine murina;
- etanercept, una proteina di fusione costituita dall'Fc della IgG1 umana e da due frammenti identici del recettore p75 del TNF- $\alpha$ ;
- adalimumab, un anticorpo di tipo IgG1 totalmente umanizzato (sia le regioni variabili che costanti sono di origine umana);
- golimumab, un anticorpo monoclonale umano IgG1 $\kappa$ .

### ***Infliximab***

Infliximab è approvato per il trattamento della SA, della psoriasi, dell'AP, dell'Artrite Reumatoide, dell'artrite idiopatica giovanile e delle malattie infiammatorie intestinali.

Si somministra tramite infusione intravenosa al tempo 0, a 2, a 6 e dopodiché ogni 6-8 settimane. La dose raccomandata è di 5 mg/kg nella spondilite anchilosante e nell'artrite psoriasica. La presenza di sequenze murine è associata alla formazione di anticorpi antichimera che possono portare a reazioni al momento dell'infusione e ad una riduzione dell'efficacia nella terapia a lungo termine<sup>128</sup>.

Questo anticorpo si lega ad alta affinità sia al TNF- $\alpha$  legato alla membrana che a quello in forma solubile ma non al TNF- $\beta$  (linfotossina)<sup>129</sup>. Infliximab ha effetti multipli, incluse la riduzione dei livelli sierici dei mediatori dell'infiammazione e l'espressione di chemochine. Esso pare ridurre la migrazione linfocitaria a livello delle articolazioni dei pazienti con AR e l'angiogenesi, attraverso una riduzione dei livelli sierici del fattore di crescita endoteliale. L'emivita di eliminazione è di circa nove giorni, ma si riscontra per un tempo più lungo nel siero se somministrato in combinazione al methotrexate.

Comuni effetti avversi includono le infezioni delle alte vie respiratorie e delle vie urinarie, cefalea, febbre, vertigini, flushing, dolori addominali, aumento delle transaminasi, stanchezza. Occasionalmente sono state riportate anomalie ematologiche, peggioramento delle sindromi demielinizzanti, ipo- e ipertensione,

aggravamento dello scompenso cardiaco, edema polmonare, alopecia, mialgie e artralgie. Raramente si sono riscontrate la neurite ottica, la polineuropatia, la sindrome di Guillain-Barré e la pancitopenia. Sono state riportate alcune reazioni all'infusione, quali febbre, prurito, orticaria, così come reazioni cardiopolmonari. Importanti anche le riacutizzazioni di tubercolosi e sepsi.

Lo studio IMPACT<sup>130</sup> (Infliximab Multinational Psoriatic Arthritis Controlled Trial) sul trattamento con infliximab dell'artrite psoriasica ha dimostrato un miglioramento dell'impegno articolare (valutato utilizzando come parametri di risposta l'ACR20 e lo PsARC) e dermatologico (PASI) rispetto al placebo. La risposta articolare ha raggiunto la significatività entro le 2 settimane di trattamento rimanendo stabile durante il periodo di 52 settimane di durata del trial. Infliximab si è dimostrato capace di ridurre la progressione radiografica dell'AP. Tali dati sono stati successivamente confermati nel trial IMPACT2<sup>131</sup>.

In uno studio multicentrico di Braun et al 70 pazienti con SA attiva sono stati randomizzati al trattamento con infliximab 5 mg/kg versus placebo. Dopo 12 settimane una maggiore percentuale dei pazienti trattati con infliximab ha manifestato una regressione dell'attività di malattia (misurata con l'indice di attività di malattia BASDAI) ed un miglioramento della funzione (utilizzando il BASFI), della mobilità spinale (valutata mediante il BASMI) e della qualità di vita rispetto al placebo. La risposta ottenuta è rimasta stabile per 3 anni<sup>132</sup>, tuttavia l'imaging non ha dimostrato significative differenze nella progressione del danno radiografico fra i pazienti trattati per due anni con infliximab e quelli trattati con terapie convenzionali<sup>133</sup>.

Nello studio ASSERT<sup>134</sup> (Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy) un numero significativamente maggiore di pazienti che hanno ricevuto infliximab per 24 settimane ha manifestato un significativo miglioramento nelle misure cliniche incluse ASAS20, ASAS40, BASDAI, BASFI e BASMI rispetto al placebo.

L'evidenza dell'efficacia di tale farmaco nella uSpA era già stata segnalata in alcuni studi prospettici. Nello studio di Van den Bosch<sup>135</sup>, ad esempio, si riporta un'efficacia di infliximab persistente nel tempo (follow-up di 4 anni) in 107 pazienti con SpA, di cui 10 affetti da uSpA. Il gruppo di Berlino<sup>136</sup> ha pubblicato il primo

trial prospettico sull'infliximab nella uSpA: 6 pazienti con malattia attiva e persistente dolore spinale infiammatorio non responsivo alla terapia con SSZ sono stati trattati con 3 o 5 mg/kg di infliximab. Alla 12<sup>a</sup> settimana si è riscontrato un significativo miglioramento del BASDAI, BASFI e del dolore spinale infiammatorio, maggiore nel gruppo trattato con dosi più elevate. In un altro lavoro<sup>137</sup> comprendente 10 pazienti con uSpA è stato riscontrato alla 12<sup>a</sup> settimana di trattamento con infliximab alla dose di 5 mg/kg un miglioramento significativo del dolore in 8/10 pazienti, dell'attività di malattia in 7/10.

### ***Etanercept***

Etanercept è stato approvato per l'uso nella SA, AP, artrite reumatoide, artrite idiopatica giovanile e nella psoriasi.

Viene prodotto tramite tecniche di DNA ricombinante<sup>138</sup> e consiste in una proteina di fusione solubile, costituita da un dimero della porzione extracellulare del recettore p75 umano per il TNF- $\alpha$ , responsabile del legame con il ligando, fuso con la porzione Fc della IgG1 umana.<sup>139</sup> Il TNF- $\alpha$  si lega ai recettori solubili e di superficie cellulare p55 e p75.<sup>140</sup> Legando il TNF- $\alpha$  in eccesso, etanercept ne blocca l'interazione con i recettori di superficie p55 e p75, inibendo in tal modo i suoi effetti biologici. A differenza dell'infliximab, etanercept si lega anche al TNF- $\beta$  (linfotossina- $\alpha$ ) ma non al TNF- $\alpha$  di membrana. L'efficacia dell'inattivazione del TNF- $\alpha$  da parte di etanercept è circa 1000 volte superiore a quella del recettore p75. Frammenti bioptici sinoviali prelevati da pazienti con AR hanno evidenziato che dopo un mese di trattamento con etanercept si riduce significativamente il numero di cellule T e di plasmacellule, i livelli di molecole di adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1) e il livello di IL-1. L'etanercept viene somministrato tramite un'iniezione sottocutanea di 25 mg due volte alla settimana o in unica dose settimanale da 50 mg.

La concentrazione massima sierica media di 2,4 mg/L viene raggiunta dopo 6 mesi di trattamento. L'emivita di eliminazione media è di 102 ore e la clearance di 0,16 L/h dopo una dose singola di 25 mg per via sottocutanea. La farmacocinetica non è stata studiata nei pazienti con funzione epatica o renale alterate.

I più comuni eventi avversi sono rappresentati dalle reazioni nel sito d'iniezione, dall' infezione, dalla cefalea, nausea e rinite.

Per quanto concerne le precauzioni per l'uso, etanercept deve essere usato con cautela in pazienti con anamnesi di infezioni ricorrenti o con fattori che possano predisporre allo sviluppo di infezioni, in caso di malattie demielinizzanti del SNC pre-esistenti o a insorgenza recente, o di anomalie ematologiche significative in anamnesi. Il trattamento non deve essere iniziato in caso di infezioni croniche attive o localizzate e deve essere interrotto nei pazienti che sviluppano un'infezione grave o una sepsi o discrasie ematiche significative.

In un trial randomizzato controllato con placebo di fase II su 60 pazienti affetti da AP<sup>141</sup>, etanercept si è dimostrato efficace nel migliorare i sintomi articolari e l'impegno cutaneo. Tali risultati sono stati confermati in un trial di fase III<sup>142</sup>, ottenendo alla 12<sup>a</sup> settimana una risposta ACR20 ed un miglioramento delle lesioni cutanee in percentuale maggiore nel gruppo trattato rispetto al placebo. Il trattamento con etanercept sembrerebbe inibire la progressione radiografica dello Sharp score, diminuendo il numero delle erosioni e il grado di riduzione della rima articolare dopo 2 anni di follow-up.

Tale farmaco si è dimostrato efficace anche nella SA: in un trial randomizzato controllato con placebo i pazienti trattati per 4 mesi con etanercept hanno presentato un significativo miglioramento rispetto al basale della rigidità mattutina, del dolore e della funzione spinale, così come della qualità di vita, dell'espansione toracica ed una riduzione degli indici di flogosi<sup>143</sup>. La risposta al trattamento è risultata rapida e sostenuta senza differenze significative nel numero di eventi avversi tra i due gruppi dopo 10 mesi di trattamento.

Tali risultati sono stati confermati in un trial multicentrico randomizzato in doppio cieco comprendente pazienti con SA moderata-severa<sup>144</sup>. Una maggiore percentuale dei pazienti trattati rispetto al gruppo placebo ha raggiunto una risposta ASAS20 alla dodicesima settimana. Le risposte cliniche risultavano significative già dopo 2 settimane di trattamento e persistevano nei due anni successivi di follow-up. Oltre al miglioramento della clinimetria, i pazienti trattati con etanercept hanno dimostrato una significativa riduzione dell'infiammazione spinale.

Brandt e collaboratori<sup>145</sup> ha pubblicato un trial in aperto su 10 pazienti con uSpA trattati con etanercept: dopo 12 settimane di terapia, 6/10 pazienti hanno dimostrato un miglioramento superiore al 50% del BASDAI, 2/10 pazienti hanno manifestato un ulteriore miglioramento anche dopo la cessazione del farmaco, mentre 4 degli 8 pazienti che avevano risposto alla terapia hanno presentato una recidiva dopo una media di 4,5 settimane dalla sua sospensione.

### ***Adalimumab***

Adalimumab è approvato per il trattamento della SA, della psoriasi, dell'AP, dell'Artrite Reumatoide, dell'artrite idiopatica giovanile e delle malattie infiammatorie intestinali. Si tratta di un anticorpo completamente umanizzato diretto contro il TNF- $\alpha$  che inibisce il legame del TNF- $\alpha$  ai recettori p55 e p75.<sup>146</sup> Adalimumab si lega sia alla forma solubile, che alla forma di membrana del TNF- $\alpha$ , ma non al TNF- $\beta$ . Dopo una singola iniezione sottocutanea di 40 mg presenta una biodisponibilità del 64%, raggiunge la concentrazione massima dopo circa 130 ore e presenta un'emivita di eliminazione di circa due settimane. Grazie alla sostituzione degli elementi murini con sequenze umane si riduce la produzione di anticorpi capaci di neutralizzarlo.

Nello studio di Mease e collaboratori<sup>147</sup> su 313 pazienti con artrite psoriasica il 58% dei pazienti ricevanti adalimumab ha ottenuto una risposta ACR20 dopo 12 settimane di trattamento rispetto al 14% dei pazienti trattati con placebo ( $P < 0.001$ ). Una risposta rapida e significativa è stata osservata anche nell'impegno cutaneo così come nel miglioramento della qualità di vita e dell'astenia. Come per gli altri farmaci anti-TNF- $\alpha$  è stata dimostrata un'inibizione della progressione del danno erosivo. L'efficacia di adalimumab nell'AP è stata confermata nel successivo trial di Genovese et al<sup>148</sup>, eseguito su 100 pazienti randomizzati al trattamento con adalimumab versus placebo: alla dodicesima settimana di follow-up il 39% ed il 51% dei soggetti trattati con il farmaco ha ottenuto una risposta ACR20 e PsARC, rispettivamente, versus il 16% e il 24% dei soggetti nel braccio placebo. Alla 24<sup>a</sup> settimana di trattamento si è osservato un ulteriore aumento della percentuale di responders ACR20, che ha raggiunto il 65%.



In un trial multicentrico randomizzato placebo-controllo il 58% dei pazienti con SA trattati con adalimumab ha ottenuto alla 12<sup>a</sup> settimana una risposta ASAS20 rispetto al 21% dei pazienti trattati con placebo ( $P < 0.001$ )<sup>149</sup>, così come è stato riscontrato un miglioramento negli indici di mobilità spinale e della funzione articolare. Una remissione parziale è stata osservata nel 22% dei pazienti ricevanti il farmaco attivo rispetto al 6% del placebo.

### ***Golimumab***

Golimumab è approvato per il trattamento dell'AR, AP e SA. Si tratta di un anticorpo monoclonale umano IgG1k prodotto da una linea cellulare di ibridomi murini con tecnologia DNA ricombinante. Viene somministrato per via sottocutanea alla dose di 50 mg una volta al mese. I dati disponibili suggeriscono che la risposta clinica viene raggiunta solitamente entro 12-14 settimane dall'inizio del trattamento (dopo 3-4 dosi). Golimumab è controindicato nei pazienti con tubercolosi (TBC) in fase attiva o altre infezioni gravi quali sepsi e infezioni opportunistiche e nei pazienti con insufficienza cardiaca da moderata a grave (Classe III/IV NYHA).

Golimumab forma complessi stabili ad elevata affinità sia per la forma solubile, sia per quella transmembrana bioattiva del TNF- $\alpha$  umano, impedendo il legame del TNF- $\alpha$  ai suoi recettori. Il legame di golimumab al TNF umano ha mostrato di inibire l'espressione sulla superficie cellulare, indotta dal TNF- $\alpha$ , delle molecole di adesione, selettina E, molecola di adesione alle cellule vascolari di tipo 1 (VCAM) e molecola di adesione intracellulare di tipo 1 (ICAM) da parte delle cellule endoteliali umane. In vitro golimumab è in grado di inibire anche la secrezione TNF-indotta di interleuchina (IL)-6, IL-8 e fattore stimolante la crescita delle colonie granulocitarie e macrofagiche (GM-CSF) da parte delle cellule endoteliali umane. Il trattamento con golimumab ha ridotto significativamente i livelli di proteina C-reattiva (PCR), IL-6, ICAM-1, metallo proteinasi della matrice 3 (MMP) e fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), rispetto al trattamento di controllo. Inoltre, nei pazienti con AR e SA è stata dimostrata una riduzione dei livelli di TNF- $\alpha$  e di IL-8. Queste variazioni sono state osservate nella prima

valutazione (settimana 4) dopo la somministrazione iniziale di golimumab e sono durate fino alla settimana 24.

L'efficacia e la sicurezza di golimumab nell'AP sono state valutate in uno studio clinico multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo (GO-REVEAL), condotto in oltre 405 pazienti adulti con AP in fase attiva ( $\geq 3$  articolazioni tumefatte e  $\geq 3$  articolazioni dolenti), nonostante la terapia con antinfiammatori non steroidei (FANS) o DMARD. Il 48% circa dei pazienti ha continuato la somministrazione di dosi stabili di metotrexate ( $\leq 25$  mg/settimana). La percentuale di pazienti che hanno ottenuto una risposta ACR 20 alla settimana 14 è risultata del 51% nel gruppo trattato vs 9% gruppo placebo. Le risposte osservate nei gruppi di trattamento sono risultate simili nei pazienti trattati o meno con MTX concomitante.

L'efficacia e la sicurezza di golimumab nella SA sono state valutate in uno studio clinico multicentrico, in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo (GO-RAISE), condotto su 356 pazienti adulti con spondilite anchilosante in fase attiva (BASDAI con punteggio  $\geq 4$  e una VAS per dolore lombare totale  $\geq 4$  su una scala da 0 a 10 cm). L'endpoint primario consisteva nella percentuale di pazienti con risposta ASAS 20 (Ankylosing Spondylitis Assessment Study Group) alla settimana 14. I dati di efficacia controllata con placebo sono stati raccolti e analizzati alla settimana 24. Non sono state osservate differenze clinicamente significative nelle misure dell'efficacia fra i regimi posologici con 50 mg e 100 mg. Alla settimana 14, il 59% dei pazienti in trattamento aveva ottenuto una risposta ASAS20 vs il 22% del gruppo controllo. È stata osservata un'efficacia comparabile a prescindere dall'uso di DMARD (MTX, sulfasalazina e/o idrossiclorochina), presenza dell'antigene HLA-B27 o livelli basali di PCR in base alla valutazione delle risposte ASAS 20 alla settimana 14.

I quattro farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  attualmente in uso nelle spondiloartriti sieronegative, etanercept, infliximab, adalimumab e golimumab hanno ampiamente dimostrato di ridurre e/o sopprimere l'attività di malattia nelle SpA.

Nonostante abbiano tutti come target la stessa molecola, il TNF- $\alpha$ , presentano alcune differenze significative nell'ambito dell'efficacia clinica e della sicurezza: etanercept, ad esempio, si è dimostrato inefficace nelle malattie infiammatorie intestinali e presenta un minore rischio di riattivazione tubercolare rispetto agli anticorpi monoclonali (mAb). Questo suggerisce l'esistenza di altri meccanismi d'azione oltre alla neutralizzazione del TNF- $\alpha$  solubile (Fig.6)<sup>150</sup>.

Etanercept è l'unico tra gli antagonisti del TNF- $\alpha$  in grado di legare la LT $\alpha$ 3 nella forma solubile e la LT $\alpha$ 2 $\beta$ 1 di membrana; una possibile conseguenza che ne deriva è la mancata completa neutralizzazione del TNF- $\alpha$  in presenza di elevate concentrazioni tissutali della LT $\alpha$ 3.

Gli effetti mediati dalla porzione Fc dei tre anticorpi monoclonali e dall'etanercept differiscono in relazione alla capacità di formare complessi con il TNF- $\alpha$ . Le IgG monomeriche legano l'Fc $\gamma$ RI ad alta affinità, mentre la creazione di un legame stabile ai recettori a bassa affinità Fc $\gamma$ RII ed Fc $\gamma$ RIII richiede la presenza di interazioni multimeriche (ad es. mediate dai complessi IgG). Gli mAb adalimumab, infliximab e golimumab sono tutti bivalenti con specificità per la subunità monomerica dell'omotrimero del TNF- $\alpha$ ; ciò significa che un Ab monoclonale può legare contemporaneamente due subunità monomeriche dello stesso omotrimero o di due diverse molecole di TNF- $\alpha$ , portando nel secondo caso alla formazione di complessi TNF-mAb delle dimensioni di 600 kDa e di 5000 kDa nel caso di adalimumab ed infliximab, rispettivamente. Etanercept, invece, si lega a due siti recettoriali dello stesso omotrimero del TNF- $\alpha$  e non è in grado di formare complessi di maggiori dimensioni. Questo potrebbe spiegare la rapida clearance dei complessi TNF-mAb rispetto al complesso TNF-recettore e la più alta affinità di legame al TNF- $\alpha$  transmembrana degli mAb rispetto all'etanercept.

Varie funzioni cellulari, tra cui la fagocitosi, la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), la degranolazione, il rilascio citochinico e la produzione di anticorpi potrebbero essere influenzate dal legame ai recettori dell'Fc mediato dai farmaci biologici anti-TNF: è stato recentemente dimostrato che etanercept presenta una minore capacità di lisare le cellule mediante l'ADCC o l'attivazione del complemento e di sopprimere la produzione citochinica mediante il legame al TNF- $\alpha$  transmembrana.

Pertanto, l'abilità di infliximab e adalimumab, ma non di etanercept, di lisare le cellule che esprimono in superficie il TNF- $\alpha$ , potrebbe essere importante nel sopprimere la risposta infiammatoria sottostante la malattia di Crohn.

Nonostante tutti gli anti-TNF- $\alpha$  siano associati ad un aumento dell'incidenza delle infezioni, pare che i pazienti che assumono infliximab abbiano un maggior rischio di infezione, quale l'istoplasmosi, la coccidiomicosi o la riattivazione di una tubercolosi latente<sup>151</sup>. Casi di tubercolosi sono anche stati segnalati nei primi studi con l'adalimumab, in particolar modo quando venivano somministrate dosi superiori a quelle successivamente autorizzate, suggerendo quindi un effetto dose dipendente. La ragione di tale risposta non è stata completamente chiarita, però è possibile che per la loro capacità di fissare il complemento, gli anticorpi monoclonali anti-TNF- $\alpha$  interferiscano con la formazione del granuloma in modo da portare beneficio nella malattia di Crohn, ma essere dannosi per quanto concerne la riattivazione della tubercolosi.

Una migliore comprensione delle differenze biologiche e cliniche dei vari anti-TNF- $\alpha$  permetterà in futuro di ottimizzare la scelta terapeutica nel singolo individuo.

**Figura 6. Caratteristiche dei farmaci biologici anti-TNF $\alpha$**

	Infliximab	Adalimumab	Golimumab	Etanercept
Structure	Chimeric mAb	Human mAb produced by phage display	Human mAb produced in Transgenic mouse	TNFR2 Fc fusion protein
Molecular weight (kDa)	150	150	150	150
Half life	8–10 days	10–20 days	7–20 days	4 days
Ligands	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF LT $\alpha$ 3, LT $\alpha$ 2 $\beta$ 1
Neutralisation potency for sTNF	+++	+++	+++	+++
Route of administration	Intravenous Loading doses weeks 0,2, 6 then approx every 8 weeks	Subcutaneous Every other week	Subcutaneous monthly	Subcutaneous Once weekly and twice weekly dosing available
tmTNF binding	+++	+++	? (Presumed same as other mAbs)	++
complement-dependent cytotoxicity CDC	+++	+++	? (Presumed same as other mAbs)	++/–
Antibody dependent cellular cytotoxicity ADCC	+++	+++	? (Presumed same as other mAbs)	++/–
Reverse signaling and cytokine suppression	+++	+++	? (Presumed same as other mAbs)	+/–

*Curr Opin in Pharmacology 2010;10:308-315*

### **3.4.3. Implicazioni terapeutiche dei nuovi criteri classificativi delle Spondiloartriti sieronegative**

I trial iniziali che dimostrarono l'efficacia degli anti-TNF- $\alpha$  nella SpA assiale avevano arruolato pazienti con SA che presentavano la sacroileite radiografica in accordo con i criteri di NY modificati. Il successivo passo consisteva nel verificare se i pazienti con la SpA assiale non radiografica (nr-axSpA) avrebbero risposto in maniera simile (se non superiore) a questa classe di farmaci. La conferma è pervenuta mediante 3 trials clinici.

Nel primo (pubblicato nel 2008)<sup>152</sup>, effettuato su 46 pazienti con nr-axSpA il 54,5% dei pazienti trattati con adalimumab rispetto al 12,5% del gruppo placebo aveva ottenuto la risposta ASAS40 alla settimana +12, dimostrando pari efficacia di adalimumab nella nr-axSpA rispetto alla SA.

Nel secondo trial<sup>153</sup>, questa volta con infliximab vs placebo, sono stati arruolati 40 pazienti con SpA assiale (di cui 12% con sacroileite radiografica, 100% con sacroileite attiva evidenziata in RMN): il 55,6% dei pazienti trattati con infliximab vs 12,5% dei pazienti in placebo aveva conseguito la remissione parziale (secondo i criteri ASAS) ed in una percentuale significativamente maggiore nel braccio in trattamento si erano ridotti i segni di infiammazione a carico delle articolazioni sacroiliache.

Nel terzo studio<sup>154</sup> è stato posto a confronto il trattamento con etanercept vs la sulfasalazina in 76 pazienti con SpA assiale (di cui 50% in fase pre-radiografica): ad 1 anno di trattamento, il 50% del gruppo in etanercept vs il 19% in sulfasalazina aveva ottenuto la remissione parziale secondo i criteri ASAS; non sono state riscontrate differenze nella risposta tra i pazienti con SA vs nr-axSpA.

Questi dati dimostrano chiaramente che i pazienti con SpA assiale ottengono una risposta pari – se non superiore – al trattamento con anti-TNF- $\alpha$  rispetto ai pazienti con SA che soddisfano i criteri modificati di NY. La risposta tra i pazienti con SpA assiale radiografica e non-radiografica è simile quando corretta per la durata dei sintomi.

Al fine confermare i precedenti risultati e permettere l'estensione delle attuali indicazioni all'intero gruppo delle SpA assiali sono stati avviati diversi trials clinici di III<sup>a</sup> fase: con certolizumab pegol per la SpA assiale (SA e non-radiografica)<sup>155</sup>; con etanercept per la SpA assiale non-radiografica<sup>156</sup>; con golimumab per la SpA assiale radiografica<sup>157</sup>. Nel 2011 sono stati pubblicati i risultati di un trial con adalimumab su 192 pazienti con SpA assiale non-radiografica confermando una buona risposta nel gruppo in trattamento rispetto al placebo ed identificando come predittori per un outcome favorevole la minore durata di malattia ed un elevato valore della PCR<sup>158</sup>.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati i dati riguardanti il follow-up a lungo termine dei pazienti con SA trattati con infliximab<sup>159</sup>, etanercept<sup>160</sup>, adalimumab<sup>161</sup> rispettivamente a 8, 5 e 5 anni di trattamento. È stata riportata una percentuale di drop-out del 15% per anno derivante dalla comparsa di eventi avversi, inefficacia o

non-compliance. Non sono state riportate nuove segnalazioni riguardanti la sicurezza dei farmaci rispetto a quelle già note in letteratura. L'attività di malattia è migliorata ulteriormente nel tempo nei pazienti che persistevano nel trattamento.

Oltre alla minor durata di malattia, l'età più giovane e la PCR elevata, sono stati recentemente identificati quali ulteriori fattori predittivi di risposta favorevole l'HLA-B27, l'infiammazione attiva evidenziata alla RMN e la buona funzione articolare<sup>162</sup>.

Nonostante gli anti-TNF- $\alpha$  si siano dimostrati efficaci nella SpA assiale, circa il 30% dei pazienti non risponde a tali farmaci o risponde in maniera inadeguata; in più in molti pazienti non si riesce a raggiungere la remissione mentre l'infiammazione evidenziata alla RMN si riduce solamente del 70% nei pazienti che persistono in trattamento. Da qui la necessità di introdurre nuovi farmaci per i pazienti non responsivi agli anti-TNF- $\alpha$ <sup>163</sup>.

Vari farmaci biologici diretti contro molecole diverse dal TNF- $\alpha$  sono stati testati con successo in altre malattie incluse l'artrite reumatoide e la psoriasi ma non hanno dimostrato pari efficacia nelle SpA.

L'anakinra – un antagonista del recettore IL-1 approvato per l'artrite reumatoide – non si è dimostrato efficace in uno studio sulla SA<sup>164</sup>.

Rituximab, invece, non è risultato efficace in 10 pazienti con SA refrattaria agli anti-TNF- $\alpha$ , mentre ha dimostrato un'efficacia di poco inferiore agli anti-TNF in 10 pazienti anti-TNF- $\alpha$  naïve<sup>165</sup>.

Due trials clinici con abatacept hanno evidenziato l'inefficacia di tale farmaco nelle SpA assiali<sup>166</sup>.

Diversamente da quanto riportato in alcuni precedenti case reports, un recente studio con tocilizumab non ha confermato l'efficacia di tale farmaco nei pazienti con SA, anche se tale aspetto necessita di conferma in ulteriori trials clinici.

Nella patogenesi delle SpA sta sempre più emergendo il ruolo dell'asse IL-23/IL-17. Appel et al<sup>167</sup> ha riscontrato un aumento delle cellule IL-17+ a livello dell'osso subcondrale dei pazienti con SA rispetto ai controlli; si segnala tuttavia come l'IL-17 in questo caso fosse prodotta prevalentemente dai neutrofili e non dai linfociti T. Attualmente si dispone di 2 farmaci biologici in grado di bloccare tali

citochine: 1) ustekinumab - un anticorpo monoclonale diretto contro la catena p40 dell'IL-23 e IL-12 e 2) secukinumab - un antagonista dell'IL-17. Entrambi si sono dimostrati efficaci nei pazienti con psoriasi e sono attualmente testati anche nella SA.

I FANS e gli anti-TNF- $\alpha$  hanno dimostrato un effetto favorevole sul controllo dei segni e sintomi nella SpA assiale. Questo successo porta a chiedersi se essi siano anche in grado di prevenire il danno strutturale definito dai fenomeni osteoproliferativi, essendo l'anchilosi della colonna vertebrale il fattore maggiormente determinante la disabilità. Sorprendentemente uno studio risalente al 2005<sup>168</sup> aveva dimostrato che la somministrazione quotidiana rispetto a quella on demand dei FANS poteva ritardare la crescita dei sindesmofiti (misurati secondo lo score mSASSS). In un altro studio, tale effetto protettivo è stato riscontrato esclusivamente nei pazienti con elevata PCR e la presenza di sindesmofiti al basale<sup>169</sup>. L'apparente effetto protettivo dei FANS è verosimilmente attribuibile all'inibizione degli osteoblasti mediata dalle prostaglandine piuttosto che dal loro effetto anti-infiammatorio. All'opposto nessun effetto sul ritardo della progressione radiografica è stato osservato nei pazienti con SA trattati per 2 anni con infliximab, etanercept ed adalimumab. Tali scoperte hanno portato ad un'intensa ricerca sulla sequenza degli eventi che conducono al danno strutturale nella SA.

Sulla base di studi radiografici e di risonanza eseguiti nei pazienti con SpA assiale la sequenza di eventi che porta all'anchilosi sembrerebbe essere la seguente: inizialmente si osserva la comparsa di infiammazione (meglio evidenziata con le sequenze STIR in RMN), seguita dalla sostituzione adiposa del midollo osseo subcondrale (visibile come "fatty lesions" alle sequenze T1 in RMN) ed infine l'insorgere dell'osteoproliferazione (crescita dei sindesmofiti, meglio evidenziata alle radiografie). Non è ancora chiara l'esatta durata di tali eventi, così come è necessario effettuare ulteriori studi per poter confermare tali dati e chiarire se un intervento precoce con gli anti-TNF- $\alpha$  (prima che siano visualizzabili in RMN le "fatty lesions") consenta effettivamente di prevenire la comparsa dei sindesmofiti, a differenza di quanto precedentemente riportato con tali farmaci nei pazienti con malattia di lunga durata.



Per quanto concerne la SpA periferica, ad eccezione dei trials clinici effettuati sui pazienti con artrite psoriasica poliarticolare non vi sono dati sufficienti per poter trarre delle conclusioni sul trattamento più appropriato in tale forma. Esistono delle subanalisi di pazienti con impegno anche periferico (oltre a quello predominante assiale), nelle quali viene evidenziata un'efficacia della sulfasalazina nel trattamento dell'artrite periferica ed entesite. Si presuppone che con l'ausilio dei nuovi criteri classificativi per la SpA periferica verranno avviati in futuro studi focalizzati su tale gruppo clinico.

#### **3.4.4. Immunogenicità, efficacia e switching degli anti-TNF- $\alpha$**

Tutti i farmaci biologici sono potenzialmente in grado di indurre la formazione degli anticorpi anti-farmaco (anti-drug antibodies: ADAAb) e diversi studi hanno recentemente dimostrato in varie malattie infiammatorie croniche una correlazione tra la formazione degli ADAAb, la riduzione dei livelli serici del farmaco e l'inefficacia/perdita di risposta o comparsa di eventi avversi a seguito della somministrazione degli anti-TNF- $\alpha$ <sup>170</sup>.

La formazione di immunocomplessi farmaco-ADAAb potrebbe incrementare la clearance del biologico riducendone i valori serici oppure neutralizzare la parte funzionale del farmaco impedendone l'interazione con il TNF- $\alpha$ . La presenza degli ADAAb tuttavia non preclude l'efficacia terapeutica, essendo stati riscontrati tra i good responders diversi pazienti positivi agli ADAAb.

Dai dati in letteratura appare evidente la variabilità della prevalenza degli ADAAb riportata nei diversi studi. Questo è in gran parte attribuibile ai diversi metodi di analisi utilizzati. I primi test quali l'ELISA diretto ed indiretto erano caratterizzati da una minore specificità con una conseguente maggiore percentuale di falsi positivi. Altri fattori che possono interferire con la rilevazione degli ADAAb sono l'elevata concentrazione del FR o le elevate concentrazioni di farmaco nel campione da analizzare.

La prevalenza degli ADAAb anti-infliximab riportata negli studi effettuati su pazienti con AR, SpA, psoriasi e CD varia dal 6% al 61% (20%-30% nelle SpA). La presenza degli ADAAb anti-infliximab è stata associata ad una ridotta

concentrazione serica di infliximab, ad una riduzione della risposta clinica e ad un incrementato rischio di eventi avversi in seguito alla somministrazione del farmaco.

La prevalenza degli ADA<sub>Ab</sub> anti-adalimumab varia dallo 0.04% all'87% considerando gli studi effettuati su varie malattie reumatiche. Per quanto concerne le SpA, lo studio di Vries et al<sup>171</sup>, effettuato su 35 pazienti con SA, riporta una percentuale di ADA<sub>Ab</sub> pari al 31%, mentre lo studio di van Kuijk et al<sup>172</sup> del 18% in 22 casi di APs. In entrambi gli studi è stata segnalata un'associazione tra la presenza degli ADA<sub>Ab</sub>, i ridotti livelli serici del farmaco ed una ridotta efficacia terapeutica.

La frequenza riportata degli ADA<sub>Ab</sub> anti-golimumab varia dallo 0% al 7%. Nella maggior parte dei casi si tratta di studi a breve termine nei quali la bassa prevalenza di tali anticorpi non permette l'analisi di eventuali associazioni con la risposta clinica, i livelli circolanti di farmaco e la comparsa di eventi avversi.

I dati finora riportati in letteratura suggeriscono una minore immunogenicità di etanercept rispetto agli anti-TNF- $\alpha$  monoclonali, riportando una prevalenza di ADA<sub>Ab</sub> anti-etanercept variabile dallo 0-18%. Nei casi segnalati non si trattava di anticorpi neutralizzanti e non ci sono riscontri che dimostrino un'associazione tra la formazione di anticorpi anti-farmaco, ridotti livelli di etanercept o perdita di efficacia clinica.

L'uso concomitante dei DMARDs (in particolare del methotrexate) in associazione all'anti-TNF- $\alpha$  è in grado di ridurre la frequenza della formazione degli ADA<sub>Ab</sub>. La capacità del methotrexate di ridurre la produzione degli ADA<sub>Ab</sub> anti-infliximab è stata descritta nell'AR, CD, APs<sup>173</sup> e nelle SpA<sup>174</sup>. Un quesito interessante riguarda l'utilità del methotrexate nel ridurre la formazione degli ADA<sub>Ab</sub> nella SA, patologia per la quale l'uso di tale farmaco non è ad oggi raccomandato ma che potrebbe spiegare la maggiore incidenza degli ADA<sub>Ab</sub> riscontrata in tale malattia rispetto all'AR.

Un altro fattore in grado di influenzare la formazione degli ADA<sub>Ab</sub> potrebbe essere il dosaggio del farmaco utilizzato: da un confronto di 2 studi<sup>175,176</sup> sull'AR sembrerebbe che l'uso di dosi più basse di infliximab si associ ad una maggiore frequenza di sviluppo degli ADA<sub>Ab</sub>. Basse concentrazioni dell'anti-TNF- $\alpha$  si

associano generalmente alla presenza degli ADAb nei non responders, anche se questo potrebbe rappresentare un effetto degli ADAb piuttosto che esserne la causa. Ipoteticamente, basse dosi di anti-TNF- $\alpha$  potrebbero favorire la formazione degli ADAb e l'aumento della clearance del farmaco portando ad una perdita di risposta; questo potrebbe spiegare le riacutizzazioni che si osservano alla riduzione della dose e/o all'incremento dell'intervallo tra le somministrazioni che spesso si effettuano nei pazienti che hanno ottenuto la remissione clinica.

La variabilità dell'incidenza degli ADAb riportata in letteratura dipende in parte anche dal timing di raccolta dei campioni (rispetto all'ultima somministrazione di farmaco), fattore in grado di modificare in maniera importante la sensibilità del test.

La variabilità biologica individuale (che dipende a sua volta da una diversa predisposizione genetica, dalle differenze nelle caratteristiche cliniche del soggetto, quali ad es. la durata e severità di malattia) potrebbe spiegare le differenze osservate nello sviluppo degli ADAb tra i soggetti appartenenti ad un medesimo studio. A tale proposito Bartelds et al riportano una possibile influenza del polimorfismo del gene dell'IL-10 nella formazione degli Ab anti-ADA<sup>177</sup>.

La definizione di fallimento dei farmaci anti-TNF- $\alpha$  è clinica ed attualmente non è consuetudine dosare la presenza degli ADAb sia nel caso di fallimento primario (risposta al farmaco assente) che secondario (perdita di risposta). Di fronte al fallimento di un anti-TNF- $\alpha$  le possibili strategie terapeutiche adottate includono un aumento del dosaggio dello stesso anti-TNF- $\alpha$ , lo switch verso un secondo anti-TNF- $\alpha$  o un altro farmaco biologico con diverso meccanismo d'azione.

La conoscenza del valore predittivo del dosaggio serico dell'anti-TNF- $\alpha$  e degli ADAb potrebbe modificare in maniera radicale la gestione dei pazienti in trattamento con i farmaci biologici.

Nei pazienti con SpA in trattamento con infliximab, ad esempio, si è osservato un miglioramento clinico conseguente alla riduzione dell'intervallo delle somministrazioni più frequentemente nei pazienti ADAb negativi<sup>178</sup>. Nell'AR, i pazienti positivi agli ADAb diretti contro il primo anti-TNF- $\alpha$  ottengono con lo switch verso un secondo anti-TNF- $\alpha$  una risposta simile a quella riscontrata nei pazienti

anti-TNF- $\alpha$  naïve, e superiore a quella osservata per i pazienti switcher ADAb negativi<sup>179</sup>. Da questo si può dedurre che nei pazienti ADAb negativi il fallimento dell'anti-TNF- $\alpha$  potrebbe dipendere dall'errato target terapeutico, permettendo in tal modo di identificare precocemente i pazienti nei quali il TNF- $\alpha$  svolge un ruolo minore nella patogenesi della malattia e che beneficerebbero maggiormente dello switch verso un farmaco con diverso meccanismo d'azione piuttosto che verso un secondo anti-TNF- $\alpha$ .

I dati fin qui presentati sottolineano l'importanza dell'utilizzo del dosaggio degli ADAb e delle concentrazioni sieriche dell'anti-TNF- $\alpha$  quale strumento decisionale nella pratica clinica. A tal fine è necessario ottenere quanto prima la standardizzazione dei metodi di analisi, la definizione dei valori di cut-off per la positività degli ADAb e la definizione delle concentrazioni terapeutiche di ogni singolo anti-TNF- $\alpha$ .

### **3.4.5. Considerazioni sui costi**

I costi correlati ad una determinata malattia possono essere suddivisi in diretti ed indiretti. I costi diretti si riferiscono a quelli attribuibili all'intervento terapeutico, mentre quelli indiretti alla perdita di produttività secondaria alla morbidità e mortalità.

Nel 2006 Huscher et al<sup>180</sup> ha analizzato i costi annui di varie malattie reumatiche tra cui anche la SA e AP, stimando l'ammontare dei costi diretti per paziente a €3676 nella SA e di €3156 nell'AP. Aggiungendo anche i costi indiretti, si otteneva un incremento dei costi annuali totali per paziente a €13513 nella SA ed a €11075 nell'AP. I costi dipendevano soprattutto dallo stato funzionale e crescevano con la durata della malattia.

Due recenti studi hanno stimato i costi economici secondari alla SA rispettivamente nella popolazione inglese e statunitense<sup>181</sup>. Entrambi gli studi

dimostrano che i costi totali sono in larga parte determinati dai costi indiretti, ammontando al 74% dei costi totali nello studio di Ward e al 58% nello studio di Kobelt. In tali studi il costo totale annuale per paziente variava tra le 4759 e le 7203 sterline (esclusi i costi dei farmaci biologici). Tali cifre risultano relativamente basse se confrontate con quelle dell'artrite reumatoide; tuttavia, considerato l'esordio della malattia in giovane età e le verosimili numerose successive assenze dal lavoro secondarie alla disabilità con conseguente perdita di produttività si suppone che tali costi siano destinati a crescere a lungo termine.

Una recente metanalisi di 6 studi di costo-efficacia sull'adalimumab, etanercept ed infliximab nel trattamento della SA segnala che nessuno di tali farmaci possiede un buon profilo di costo-efficacia a breve termine: adalimumab ed etanercept presentano un simile valore di ICERs (Incremental Cost-effectiveness Ratios), inferiore a 30000 sterline, mentre infliximab è risultato il meno conveniente in termini di costo-efficacia presentando una ratio pari a 40000-50000 sterline per QALY (quality-adjusted life year).

Come in altre malattie croniche, anche nella SA la stima del profilo di costo-efficacia dei trattamenti andrebbe estrapolata nel lungo-termine, quando si può ragionevolmente ritenere che emergano le effettive differenze tra costi e benefici<sup>182</sup>. Questo approccio permetterebbe di includere nella valutazione l'eventuale ritorno economico dettato ad es. dalla ridotta necessità di assistenza sanitaria e dall'incremento della produttività lavorativa, e di effettuare l'analisi farmacoeconomica non sul singolo anti-TNF- $\alpha$  ma su più farmaci biologici utilizzati in sequenza, simulando quanto avviene nella pratica clinica quotidiana<sup>183</sup>.

Per quanto concerne l'AP, la maggior parte degli studi sugli anti-TNF- $\alpha$  che hanno dimostrato un buon profilo di costo-efficacia sia sull'impegno cutaneo che muscoloscheletrico è stata effettuata utilizzando dati provenienti da trials clinici<sup>184</sup>. Bansback et al<sup>185</sup> ha stimato i costi dell'etanercept per QALY guadagnato pari a €30000 su un periodo di 10 anni confrontando tale farmaco con i DMARDs leflunomide, methotrexate e ciclosporina. Nello studio di Eandi et al<sup>186</sup> adalimumab è risultato costo-efficace nel trattamento dell'AP, mentre nel lavoro di Bravo Vergel et al<sup>187</sup> infliximab è risultato meno conveniente in termini di costo-efficacia rispetto

all'etanercept, probabilmente a causa delle maggiori spese relate alla somministrazione del farmaco a fronte di un marginale incremento dell'efficacia.

In un recente studio italiano multicentrico è stata eseguita un'analisi di costo-efficacia degli anti-TNF- $\alpha$  in 107 pazienti affetti da AP<sup>188</sup>. In tale studio 93/107 pazienti sono stati trattati con etanercept, 15/107 con infliximab e 8/107 con adalimumab. I costi (espressi in euro 2007) e l'utilità (valutata con EuroQol) sono stati analizzati prima e dopo l'avvio dell'anti-TNF- $\alpha$  per poter stimare il costo incrementale per QALY guadagnato. Alla fine dei 12 mesi di trattamento si è osservato un incremento dei costi diretti a causa dell'aumento del costo dell'anti-TNF- $\alpha$  solo parzialmente controbilanciati dalla riduzione dei costi indiretti. Negli ultimi 6 mesi di trattamento, i costi diretti sono aumentati di €5052, quelli del SSN di €5044 ed i costi sociali di €4638. Tuttavia un guadagno di 0.12 QALY è risultato in un costo per QALY guadagnato pari a €40876 per il SSN e a €37591 per la società. La curva di accettabilità ha dimostrato che esiste una probabilità del 97% che la terapia con anti-TNF- $\alpha$  possa essere considerata costo-efficace ad un valore soglia di €60000 per QALY guadagnato.

Cummins et al<sup>189</sup> ha recentemente stimato la probabilità di un profilo favorevole di costo-efficacia per golimumab nell'AP attiva dell'89% con un valore soglia di 30000 sterline per QALY guadagnato.

### **3.5. Polimorfismi genici di TNF- $\alpha$ , TNFRII e recettore Fc $\gamma$ IIIa: analisi della possibile influenza sulla risposta agli inibitori del TNF- $\alpha$ e della suscettibilità allo sviluppo di malattia nelle spondiloentesoartriti sieronegative**

#### **3.5.1. Il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$**

Il TNF- $\alpha$  è una potente citochina pro-infiammatoria implicata nella patogenesi di varie malattie. La posizione del suo gene all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità e le diverse attività biologiche hanno fatto supporre che i polimorfismi all'interno di questo locus possano contribuire alla patogenesi di un ampio spettro di malattie autoimmuni ed infettive. Recenti studi hanno dimostrato che i livelli circolanti di TNF- $\alpha$  sono elevati nell'artrite reumatoide ed in altre malattie autoimmuni. Si ipotizza quindi che i livelli di tale citochina in vivo possano essere influenzati dai polimorfismi del gene del TNF- $\alpha$ .

Diversi polimorfismi sono stati identificati all'interno del promotore del TNF- $\alpha$  nelle seguenti posizioni (in relazione al sito di avvio della trascrizione): -1031 (T $\rightarrow$ C), -863 (C $\rightarrow$ A), -857 (C $\rightarrow$ A), -851 (C $\rightarrow$ T), -419 (G $\rightarrow$ C), -376 (G $\rightarrow$ A), -308 (G $\rightarrow$ A), -238 (G $\rightarrow$ A), -162 (G $\rightarrow$ A), -49 (G $\rightarrow$ A). Tra questi i più studiati sono il polimorfismo -308 A/G e -238 A/G. I polimorfismi a livello del promotore del TNF- $\alpha$  potrebbero influenzare il legame dei fattori di trascrizione, alterando i conseguenti livelli di mRNA e delle proteine codificate. Gli studi a tale riguardo hanno prodotto risultati contrastanti.

Il polimorfismo del singolo nucleotide alla posizione -308 del promotore del gene del TNF- $\alpha$  determina due forme alleliche: la più comune (TNFA\*1) data dalla guanina e quella più rara (TNFA\*2) dall'adenosina. La presenza dell'allele TNFA\*2 è stata correlata ad un'aumentata produzione di TNF- $\alpha$  in esperimenti sia in vitro che in vivo<sup>190</sup>. La stimolazione in vitro della produzione di TNF- $\alpha$  da parte delle cellule provenienti da individui omozigoti G/G e da soggetti eterozigoti A/G ha prodotto risultati conflittuali. Due studi riportano un'aumentata produzione del TNF- $\alpha$  associata all'eterozigosi A/G<sup>191</sup>, mentre altri non hanno confermato tale

associazione<sup>192,193</sup>. E' necessario però segnalare che studi diversi hanno usato differenti concentrazioni di LPS per la stimolazione della produzione di TNF- $\alpha$  in vitro ed il numero di individui con il genotipo A/G era, nella maggior parte dei casi, molto piccolo limitando la potenza dello studio. Si ipotizza che l'allele A possa influenzare la trascrizione genica del TNF- $\alpha$ <sup>194</sup>: ulteriori studi non sono stati in grado, però, di confermare tale ipotesi.

Il polimorfismo del gene del TNF- $\alpha$  regolandone la produzione potrebbe avere un ruolo nella patogenesi di diverse malattie o influenzare il grado di severità delle stesse. Poiché la maggior parte delle malattie autoimmuni sono associate all'HLA i risultati provenienti da studi sul polimorfismo del TNF- $\alpha$  potrebbero essere interpretati nell'ambito di un linkage disequilibrium con l'HLA o viceversa.

I lavori ad oggi pubblicati atti a valutare il ruolo del polimorfismo del TNF- $\alpha$  nella patogenesi delle spondiloartriti hanno prodotto risultati contraddittori. Nei primi dati di Verjans et al.<sup>195,196</sup> e Fraile et al.<sup>197</sup> non era stato riscontrato un effetto diretto del polimorfismo del TNF- $\alpha$  sulla suscettibilità alla SA. In contrasto, lo studio di McGarry et al.<sup>198</sup> ha dimostrato che l'allele G del polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  era significativamente incrementato nei pazienti con SA, analogamente a quanto riportato da Höhler et al riguardo al ruolo protettivo dell'allele A sulla suscettibilità per l'AP<sup>199</sup> e per la SA<sup>200</sup> nei soggetti HLA-B27 positivi. In uno studio più recente di Poddubnyy et al<sup>201</sup> non sono emersi dati conclusivi sul ruolo esercitato dal polimorfismo del promotore del TNF- $\alpha$  sulla produzione citochinica, anche se l'allele A parrebbe associarsi ad una minore percentuale di T-cellule CD4+ secernenti TNF- $\alpha$ . Viceversa, Rudwaleit et al.<sup>202</sup> aveva ipotizzato un ruolo protettivo dell'eterozigosi A/G nei soggetti HLA B27 positivi associata ad un'aumentata produzione del TNF- $\alpha$  rispetto all'omozigosi G/G. Sousa et al<sup>203</sup> hanno associato i genotipi AG/AA ad un esordio tardivo di malattia.

Vargas-Alarcon et al.<sup>204</sup> hanno dimostrato che la presenza dell'allele A e del genotipo AG del polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  si associa ad una maggiore suscettibilità per la uSpA in modo simile a quanto osservato nello studio di Shiau et al<sup>205</sup>. Nella popolazione cinese è stato segnalato che l'aplotipo HLA-A33-B58-Cw10 associato al polimorfismo -308 A/G del promotore del TNF- $\alpha$  potrebbe



giocare un ruolo importante nella patogenesi della SA, in parte a causa di un'aumentata produzione del TNF- $\alpha$ <sup>206</sup>.

In tre recenti metanalisi, la prima di Lee et al<sup>207</sup>, comprendente 8 studi e 2247 soggetti complessivi, la seconda di Li et al del 2010<sup>208</sup>, effettuata su 14 studi e 3880 casi, l'ultima di Wang et al<sup>209</sup> di quest'anno, che ha compreso 22 articoli, 2506 pazienti e 3023 controlli, non sono stati confermati i dati riguardo all'associazione tra il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  e la SA.

Per quanto concerne l'AP, nello studio di Balding et al<sup>210</sup> la presenza dell'allele A è stata associata ad un pattern di malattia più severa (caratterizzata da un aumentato numero di erosioni articolari e maggiore progressione radiografica di malattia), mentre negli studi di Rahman et al<sup>211</sup> e Nishibu et al<sup>212</sup> tale associazione non è stata confermata.

Gli anti-TNF- $\alpha$  rappresentano la terapia più efficace nella SpA. Tuttavia esiste una larga eterogeneità nella risposta a tali farmaci che risultano, fra l'altro, molto costosi e non esenti da effetti collaterali. I predittori genetici di risposta dovrebbero, per tale motivo, essere utili nella selezione mirata del farmaco nel singolo paziente.

Gli studi di farmacogenetica riguardanti il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  disponibili in letteratura sono stati prevalentemente effettuati su pazienti affetti da artrite reumatoide e riportano dati contrastanti riguardo all'associazione tra tale polimorfismo e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ .

Un precedente studio francese aveva dimostrato che i pazienti affetti da artrite reumatoide con il genotipo G/G del promotore -308 del TNF- $\alpha$  hanno una migliore risposta all'infliximab rispetto ai pazienti portatori dell'allele A<sup>213</sup>. Guis et al<sup>214</sup> ha confermato tale dato anche in un gruppo di pazienti con artrite reumatoide trattati con etanercept. Nel lavoro di Maxwell JR et al<sup>215</sup> su una casistica di 1050 pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con anti-TNF- $\alpha$  (etanercept in 455 dei casi, infliximab in 450 pazienti), il raro genotipo TNF-308AA è stato associato ad una peggiore risposta rispetto al genotipo TNF-308GG nei pazienti trattati con etanercept ( $p=0,001$ ;  $n=7$ ) ma non con infliximab ( $p=0,08$ ;  $n=17$ ).

Viceversa, in uno studio su 20 pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con infliximab solo i soggetti AG hanno presentato una risposta ACR50 correlata a

maggiori livelli di TNF- $\alpha$  circolante<sup>216</sup>. Similmente, Marotte et al<sup>217</sup> ha recentemente effettuato uno studio riguardante l'eventuale associazione tra la bioattività del TNF- $\alpha$  circolante, il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  e la risposta all'infliximab in 198 pazienti con artrite reumatoide. Dalle analisi effettuate non emerge un'associazione tra il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  e la risposta clinica al farmaco. Tuttavia, i livelli di bioattività del TNF- $\alpha$  circolante sono risultati significativamente maggiori nei pazienti AG/AA versus gli omozigoti GG e nei good responders rispetto ai pazienti non responsivi al trattamento, indicando un'influenza di tale polimorfismo genico sui livelli di TNF- $\alpha$  funzionale circolante, a loro volta predittivi di risposta clinica all'infliximab.

Anche i dati provenienti dalle cinque metanalisi effettuate dal 2006 ad oggi non hanno permesso di chiarire in maniera definitiva l'effettiva associazione tra il polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  e la risposta agli anti-TNF. Due precedenti metanalisi<sup>218,219</sup> comprendenti rispettivamente 311 e 692 pazienti affetti da artrite reumatoide avevano confermato l'evidenza di una peggiore risposta nei pazienti portatori dell'allele A, indipendentemente dal tipo di anti-TNF- $\alpha$  utilizzato, come evidenziato anche ad una recente metanalisi di Zeng et al del 2012<sup>220</sup>, comprendente 15 studi per un totale di 2127 pazienti, dove è stata riscontrata una correlazione tra l'allele G e la risposta favorevole al trattamento. Tale associazione non era emersa invece in 2 precedenti metanalisi pubblicate nel 2010<sup>221,222</sup>.

Lo studio di Seitz et al<sup>223</sup> è l'unico ad oggi pubblicato ad avere valutato il ruolo predittivo di risposta agli anti-TNF- $\alpha$  del polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  in una casistica comprendente anche pazienti con SpA. Tale polimorfismo è stato analizzato in 54 pazienti con artrite reumatoide e 32 con SpA (di cui 22 SA e 10 AP). Sessantatre su 86 pazienti sono stati trattati con infliximab, 10/86 e 13/86 con etanercept ed adalimumab, rispettivamente. La risposta è stata valutata mediante DAS28 per i pazienti con artrite reumatoide e AP e BASDAI per i pazienti affetti da SA. Tre pazienti omozigoti per l'allele A (affetti da artrite reumatoide) e 2 pazienti con SA portatori del genotipo AG non hanno risposto al trattamento. Indipendentemente dal tipo di patologia, l'eterozigosi AG è risultata predominante nei pazienti con risposta moderata, mentre i good responders sono risultati tutti

omozigoti per il genotipo GG, suggerendo una migliore risposta al trattamento con gli anti-TNF- $\alpha$  in tale gruppo rispetto ai soggetti portatori dell'allele A.

### **3.5.2. Il polimorfismo 196 M/R del TNFRII**

Gli effetti biologici del TNF- $\alpha$  sono mediati attraverso il legame ai suoi due recettori, il TNFRI (p55/60 TNF receptor type I, CD120a) e il TNFRII (p75/80 TNF receptor type II, CD120b) che sono membri della superfamiglia dei recettori del TNF.

A differenza del TNFR2, il TNFR1 contiene il death domain (DD) e perciò appartiene al sottogruppo dei recettori della morte, essendo capace di reclutare altre proteine DD attraverso un'associazione di tipo omofilico<sup>224</sup>. Malgrado la mancanza del DD, il TNFR2 può indurre la morte cellulare attraverso la proteina RIP, indicando dei distinti meccanismi di segnalazione molecolare per l'apoptosi indotta dal TNFR2. È stato riportato che la morte cellulare TNFR2-mediata si basa sull'induzione del TNF- $\alpha$  endogeno e sul successivo triggering del TNFR1. In più, è oggi largamente accettato che il reclutamento del TNFR2 può risultare in una deplezione del TRAF2 cIAP1-dipendente. Questo porterebbe a un aumento dell'apoptosi TNFR1-mediata senza il coinvolgimento del TNF- $\alpha$  endogeno<sup>225</sup>.

Mentre il TNF- $\alpha$  solubile si lega a entrambi i recettori del TNF ed è un importante attivatore del TNFR1, è stato riportato che il TNFR2 viene pienamente attivato solo dopo stimolazione da parte del TNF- $\alpha$  legato alla membrana cellulare.

Inizialmente si riteneva che il TNFR2 giocasse un ruolo di minore importanza nel sistema del TNF, esercitando funzioni di supporto. Tuttavia, l'uso degli anticorpi selettivi per il TNFR1 o TNFR2 ad azione agonista e dei ligandi specifici per il recettore, quali le TNF- $\alpha$  muteine, portò alla scoperta di differenti vie di segnalazione utilizzate dai due sottotipi recettoriali. Il gene del TNFR2 è localizzato sul cromosoma 1p36.2 ed è costituito da 10 esoni e 9 introni<sup>226</sup>.

La scoperta che il TNFR solubile è coinvolto nella regolazione endogena dell'attività del TNF ha indotto molto interesse nella sua potenziale applicazione come agente immunoterapico (cfr. Etanercept, una proteina di fusione umana del

TNFR2 solubile con la regione Fc delle IgG1). L'ipotesi di un possibile coinvolgimento del gene del TNFR2 nella patogenesi dell'AR condusse alla successiva scoperta dell'esistenza di un polimorfismo di un singolo nucleotide all'interno del sesto esone di tale gene. Esso consiste in una sostituzione di una singola base nel codone 196 (ATG→AGG) che porta ad una sostituzione amminoacidica non conservativa della metionina (M) in arginina (R) all'interno del quarto dominio extracellulare del TNFR2. Le analisi di tipo molecolare e funzionale suggeriscono che l'allele 196R sia funzionalmente distinto dall'allele 196M<sup>227</sup>. È stata riportata un'associazione di questa variante con un'aumentata suscettibilità per le malattie infiammatorie croniche, quali il lupus eritematoso sistemico<sup>228 229</sup>, la mielopatia associata all'HTCLV1<sup>230</sup>, la periodontite, l'artrite reumatoide familiare<sup>231,232</sup> e la colite ulcerosa<sup>233</sup>.

Till A et al<sup>234</sup> ha scoperto che la variante TNFR2<sup>196ARG</sup> ha una capacità significativamente inferiore di indurre la segnalazione del NF-κB. Questa ridotta capacità si associa ad una ridotta induzione dei geni target del NF-κB che trasmettono messaggi antiapoptotici o proinfiammatori, quali il cIAP1, cIAP2, TRAF1, IL-6 e IL-8.

È stato anche dimostrato che la trasduzione TNFR2 mediata non coinvolge solo la pathway del NF-κB, ma può anche attivare la MAPK, ERK1/2 e la JNK/SAPK. Lo studio di Till et al suggerisce che le modalità di segnalazione intracellulari della MAPK e JNK/SAPK non vengano influenzate dalla mutazione del TNFR2<sup>196ARG</sup>, così come non si rilevano effetti diretti sull'apoptosi per mezzo della stimolazione selettiva del TNFR2. Precedenti studi avevano suggerito che la prestimolazione del TNFR2 potesse aumentare la segnalazione proapoptotica del TNFR1 attraverso una competizione per i fattori antiapoptotici legati al TRAF2<sup>235</sup>.

I valori delle forme solubili del TNFRI e II sono aumentati nei pazienti affetti da artrite reumatoide. Nonostante tali recettori possano fungere da inibitori naturali del TNF-α, i loro livelli nell'artrite reumatoide paiono insufficienti per prevenire l'azione proinfiammatoria indotta da tale citochina. Glossop et al<sup>236</sup> hanno recentemente dimostrato che i valori ematici dei TNFRs sono influenzati dal polimorfismo T676G del TNFRII, presentando una minore produzione dei TNFRs in presenza dell'allele G.

C'è una crescente evidenza del ruolo del TNFR2 nella patogenesi di diverse malattie. Nell'infiammazione intestinale, il TNFR2 è sovraespresso nelle cellule T della lamina propria e del sangue periferico di pazienti affetti dal morbo di Crohn. A dimostrazione di ciò, studi su topi TNFR2<sup>-/-</sup> evidenziano uno sviluppo normale delle cellule T ma una sensibilità ridotta alla attivazione della morte cellulare, indicando che TNFR2 può aumentare le funzioni citotossiche del TNFR1 o di altri recettori della morte<sup>237</sup>. Inoltre, si è visto che i topi TNFR2<sup>-/-</sup> sono meno suscettibili allo sviluppo di malattie infiammatorie croniche.

Diversi studi sono stati intrapresi per testare l'associazione tra il SNP (single-nucleotide polymorphism) nel sesto esone del gene del TNFR2 e la suscettibilità all'AR. Due studi<sup>238,239</sup> non dimostrarono una significativa associazione tra il SNP e l'AR, mentre altri studi eseguiti nei pazienti inglesi<sup>240</sup> e francesi<sup>241</sup> affetti da AR indicano un'associazione tra il genotipo TNFRII 196R/R e la forma familiare, ma non quella sporadica di AR. Il lavoro Goëb et al<sup>242</sup> ha confermato un'associazione tra l'allele 196R del TNFRII e lo sviluppo di artrite reumatoide nei pazienti con forme precoci di malattia.

Rappresenta ancora una questione aperta se l'eterozigosi o la monozigosi siano necessarie per determinare un fenotipo diverso. A questo proposito i dati preliminari dello studio riguardanti la risposta alla terapia con anti-TNF- $\alpha$  sembrano suggerire una possibile influenza dell'allele G anche nell'assetto eterozigote. Vi sono anche in questo caso dati discordanti sul ruolo che tale polimorfismo esercita nella risposta agli anti-TNF- $\alpha$ .

In alcune recenti pubblicazioni è stata valutata la possibile influenza di tale polimorfismo nella risposta ai farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  nell'artrite reumatoide. In particolare, gli studi di Fabris et al<sup>243</sup> e Chatzikyriakidou et al<sup>244</sup>, effettuati su un gruppo di 175 (di cui 66 in anti-TNF) e 58 pazienti con AR, rispettivamente, suggerirono che la presenza dell'allele 196R possa influenzare negativamente la risposta ai farmaci anti-TNF. Anche in uno studio più recente<sup>245</sup>, comprendente 105 pazienti arruolati, di cui 55 trattati con etanercept, 40 con infliximab e 10 con adalimumab, è emersa una minore risposta negli eterozigoti TG rispetto ai pazienti omozigoti per l'allele T, indipendentemente dal tipo di agente utilizzato.

Tale associazione non è stata confermata in uno studio più recente effettuato su 234 pazienti con AR<sup>246</sup>.

Nel 2009 sono stati pubblicati due studi atti a valutare l'associazione tra il presente polimorfismo e la suscettibilità alla SA. Il primo<sup>247</sup> ha confrontato 220 pazienti affetti da SA HLA-B27+ con 140 controlli HLA-B27+ e 180 controlli B27 negativi: dai confronti effettuati è emersa una maggiore prevalenza del genotipo TG e della frequenza dell'allele G nei pazienti rispetto ad entrambi i gruppi controllo. Nel secondo studio<sup>248</sup>, invece, di numerosità campionaria ridotta rispetto al precedente (49 SA vs 68 controlli sani), si è osservata una maggiore prevalenza dell'allele T nel gruppo dei pazienti.

Non sono stati ad oggi pubblicati studi di farmacogenetica inerenti il ruolo del polimorfismo del TNFRII e la risposta agli anti-TNF- $\alpha$  nelle SpA.

### **3.5.3. Il polimorfismo 158 V/F dell'Fc- $\gamma$ RIIIA**

Le immunoglobuline mediano varie funzioni effettrici attraverso il legame della loro porzione Fc a recettori specifici presenti sulla superficie cellulare. Il reclutamento di questi recettori per l'Fc (FcR) può influenzare alcune funzioni cellulari specifiche, quali la fagocitosi, la degranolazione, la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente, il rilascio di citochine e la regolazione della produzione di anticorpi. I polimorfismi dell'FcR modificano la funzione recettoriale aumentando o diminuendo l'affinità per le immunoglobuline. Tre classi dell'FcR sono capaci di legare gli anticorpi IgG: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) e l'Fc $\gamma$ RIII (CD16). Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII presentano isoforme multiple (Fc $\gamma$ RIIA/C e B; Fc $\gamma$ RIIIA e B).

Fc $\gamma$ RIIIA è espresso sui macrofagi, sulle cellule natural-killer e su un sottotipo di linfociti T. Il più frequente polimorfismo di tale recettore consiste nella sostituzione di una singola base nel codone 559 che porta ad una sostituzione amminoacidica non conservativa della valina (V) in fenilalanina (F) alla posizione 158 del dominio extracellulare.

Lo studio di Koene et al<sup>249</sup> ha dimostrato che l'Fc $\gamma$ RIIIA-158 F possiede una minor capacità di legare le immunoglobuline IgG1, IgG3 e IgG4 rispetto all'allele V.

La differente affinità di legame per la porzione Fc delle IgG sarebbe in grado di influenzare l'attivazione cellulare e l'induzione di apoptosi. Nella popolazione generale la distribuzione approssimativa di tale polimorfismo è risultata la seguente: 1-20% per il genotipo VV, 35-45% per il VF e 40-50% per l'FF.

I dati provenienti dalla letteratura sulla possibile associazione tra il polimorfismo FcγRIIIA ed un maggiore rischio di sviluppare malattie autoimmuni riportano risultati discordanti. Per quanto riguarda l'artrite reumatoide, diversi studi hanno indicato un possibile ruolo del polimorfismo FcγRIIIA nella suscettibilità allo sviluppo e severità di malattia, mentre altri non hanno confermato tale associazione<sup>250,251</sup>. In particolare, negli studi di Kastbom<sup>252</sup> e Morgan<sup>253</sup> i soggetti con genotipo VV e VV/VF, rispettivamente, sono stati correlati ad una maggiore suscettibilità per la malattia e ad un fenotipo più severo di artrite reumatoide, mentre nello studio di Nieto et al<sup>254</sup> è stata riportata una maggiore prevalenza del genotipo FF nei pazienti rispetto ai controlli. In una recente metanalisi di Lee YH et al<sup>255</sup> si conferma il dato di una maggiore suscettibilità per l'artrite reumatoide negli europei con genotipo VV. Non esistono ad oggi lavori pubblicati sul ruolo del polimorfismo dell'FcγRIIIA nella suscettibilità alle SpA.

Recentemente è stata segnalata la possibile correlazione determinata da una diversa affinità per le immunoglobuline tra il polimorfismo allelico dell'FcγRIIIA e l'efficacia dei farmaci biologici. Gli antagonisti del TNF-α esercitano i loro effetti biologici mediante le porzioni Fc delle IgG1, portando all'attivazione del complemento o tramite il legame ai recettori cellulari Fcγ. Il legame all' FcγRIIIA espresso sui macrofagi può indurre l'attivazione cellulare o l'apoptosi. Data l'evidenza che sia infliximab che etanercept possono indurre l'apoptosi nei macrofagi sinoviali, è possibile che il loro meccanismo d'azione risieda nel legame all'FcγRIIIA<sup>256</sup>. Il polimorfismo dell'FcγRIIIA potrebbe quindi influenzare sia l'attività biologica che la clearance degli inibitori del TNF-α. Tale effetto è già stato dimostrato nei pazienti con malattia di Crohn, dove l'omozigosi VV dell'FcγRIIIA è stata associata ad un maggiore effetto antiinfiammatorio di infliximab<sup>257</sup>.

Similmente, in uno studio sul linfoma non Hodgkin era stata evidenziata l'associazione tra la risposta al rituximab (anticorpo monoclonale anti-CD20) e il polimorfismo dell'FcγRIIIA. I pazienti omozigoti per l'allele V avevano presentato

una risposta pari al 100%, mentre i soggetti eterozigoti VF e omozigoti FF avevano risposto nel 67% e 51%, rispettivamente<sup>258</sup>. I risultati preliminari ottenuti dall'analisi effettuata su una nostra casistica di 57 pazienti affetti da artrite reumatoide in trattamento con rituximab risultavano in linea con quanto precedentemente riportato, indicando una maggiore percentuale di responders nei soggetti omozigoti per l'allele V<sup>259</sup>.

Nello studio di Tutuncu et al.<sup>260</sup> è invece stata riscontrata un'associazione tra il genotipo omozigote FF dell'FcγRIIIA e una migliore risposta alla terapia con gli inibitori del TNF nei pazienti affetti da AR e artrite psoriasica.

Tale dato è stato successivamente smentito da uno studio svedese<sup>261</sup> su 282 pazienti affetti da artrite reumatoide, in cui sono stati esaminati gli effetti di tale polimorfismo sulla risposta ad etanercept (n= 161) ed infliximab (n=112), utilizzando come criteri di risposta il DAS28, ACR20, ACR 50 e ACR70. Dopo 3 mesi di trattamento, 95 pazienti (34%) non erano risultati responsivi alla terapia, 187 pazienti (66%) avevano ottenuto una risposta ACR20, 100 pazienti (35%) una risposta ACR50 e 24 pazienti (9%) una risposta ACR70. In tale studio non è stata osservata un'associazione tra il polimorfismo FcγRIIIA e la risposta agli anti-TNF-α globale né dopo stratificazione per singolo farmaco.

Successivamente, Cañete et al.<sup>262</sup> hanno analizzato la possibile influenza del polimorfismo dell'FcγRIIIA sulla risposta all'infliximab in 91 pazienti con artrite reumatoide, riscontrando nuovamente una maggiore percentuale di good responders nel gruppo di pazienti con genotipo FF.

Per quanto concerne gli studi di farmacogenetica nelle SpA, oltre a quello già citato di Tutuncu et al (che però comprendeva solo 5 pazienti con AP), il gruppo di Morales-Lara et al<sup>263</sup> ha recentemente pubblicato un lavoro sul ruolo del polimorfismo dell'FcγRIIIA nella risposta ad infliximab in un gruppo di 90 pazienti, di cui 41 con AR, 16 con AP e 33 SA. L'attività di malattia è stata valutata utilizzando il DAS28 per l'AR ed AP ed il BASFI per la SA. Nei pazienti con SA si è osservata un'associazione statisticamente significativa tra il genotipo VF/VV ed una migliore risposta ad infliximab, mentre non si sono osservate differenze nel gruppo dell'AP; nei pazienti con AR, invece, il genotipo FF è stato associato ad una maggiore percentuale di responders ACR 20.



Viceversa, in una precedente nostra analisi effettuata su 61 pazienti con SpA non emergevano significative associazioni tra la risposta agli anti-TNF- $\alpha$  ed il presente polimorfismo, anche se l'omozigosi FF tendeva ad associarsi direttamente alla risposta ad etanercept e inversamente a quella di infliximab<sup>264</sup>.

Nello studio di Ramirez et al<sup>265</sup>, nel quale sono stati reclutati 103 pazienti affetti da AP in trattamento con anti-TNF- $\alpha$ , non è emersa alcuna correlazione con il polimorfismo dell'Fc $\gamma$ RIIIA e la risposta al trattamento valutata mediante i criteri di risposta EULAR.

## Materiali e metodi

### 4.1. Caratteristiche dei pazienti e modalità di trattamento

Sono stati arruolati 189 pazienti affetti da SpA, di cui 96 afferenti alla Clinica di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine, 42 provenienti dalla U.O.C. di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova, 35 dall'UO di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera Regionale S. Carlo di Potenza, 16 dall'Unità di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona. La diagnosi di spondiloartrite sieronegativa è stata posta secondo i criteri dell'European Spondyloarthropathy Study Group (ESSG).

In 115 pazienti l'impegno riscontrato è stato prevalentemente assiale, mentre i rimanenti 74 casi presentavano un impegno prevalentemente periferico. 68/189 (36%) pazienti erano affetti da spondilite anchilosante, 80/189 (42%) da artrite psoriasica, 41/189 (22%) da spondiloartrite indifferenziata. Alla valutazione basale tutti i pazienti risultavano candidabili al trattamento con anti-TNF- $\alpha$  (mancata risposta al trattamento tradizionale con FANS, BASDAI basale >40/100 in corso di impegno assiale, mancata risposta ad almeno un DMARD con persistenza di artrite attiva in caso di impegno periferico), 140/189 pazienti (74%) non erano stati trattati in passato con farmaci biologici (anti-TNF-naïve). Settantatre su 189 (39%) pazienti sono stati trattati con infliximab, 63/189 (33%) con etanercept, 47/189 (25%) con adalimumab, 6/189 (3%) con golimumab.

I pazienti hanno ricevuto le infusioni di infliximab o le iniezioni sottocutanee di etanercept, adalimumab e golimumab in accordo con i protocolli terapeutici standard. Settanta pazienti su 173 (40%) hanno proseguito l'assunzione di DMARDs durante le somministrazioni di anti-TNF- $\alpha$ , dei quali 39/70 (56%) con impegno prevalentemente periferico (non nota l'eventuale assunzione di DMARDs nei rimanenti 16 casi).

Le caratteristiche anagrafiche e cliniche dei pazienti studiati sono illustrate nelle tabelle 5 e 6.

**Tabella 5. Caratteristiche dei pazienti**

<b>N. pazienti</b>		189
<b>Sesso (F/M)</b>		60/129
<b>Età all'esordio (anni)</b>		36 ± 14,4
<b>Durata malattia (anni)</b>		13 ± 9,7
<b>HLA B27+</b>		61/116 (52,5%)
<b>Impegno prevalente</b>	<b>assiale (N; %)</b>	115/189 (61%)
	<b>periferico (N; %)</b>	74/189 (39%)
<b>DAS28 basale</b>		4,65 ± 1,1
<b>BASDAI basale</b>		61,8 ± 19,7
<b>Anti-TNF-α naïve (N; %)</b>		140/189 (74%)
<b>Farmaco utilizzato</b>	<b>infliximab (N; %)</b>	73/189 (39%)
	<b>etanercept (N; %)</b>	63/189 (33%)
	<b>adalimumab (N; %)</b>	47/189 (25%)
	<b>golimumab (N; %)</b>	6/189 (3%)

**Tabella 6. Caratteristiche dei pazienti suddivisi per patologia**

		<b>SA</b>	<b>AP</b>	<b>uSpA</b>
<b>N. pazienti (N; %)</b>		68/189 (36%)	80/189 (42%)	41/189 (22%)
<b>Sesso (F/M)</b>		13/55	26/54	21/20
<b>Età all'esordio (anni)</b>		30 ± 12,7	40 ± 14	37 ± 15,1
<b>Durata malattia (anni)</b>		17 ± 11,8	12 ± 7,3	10 ± 8,1
<b>HLA B27+ (N; %)</b>		37/54 (68,5%)	4/32 (12,5%)	20/30 (66,7%)
<b>Impegno prevalente</b>	<b>assiale (N; %)</b>	68/68 (100%)	18/80 (22,5%)	30/41 (73%)
	<b>periferico (N; %)</b>	0/68 (0%)	62/80 (77,5%)	11/41 (27%)
<b>DAS28 basale</b>		-	4,75 ± 1,1	4,29 ± 0,7
<b>BASDAI basale</b>		61 ± 20,2	56,9 ± 18,2	66,6 ± 19,2
<b>Anti-TNF-α naïve (N; %)</b>		55/68 (81%)	57/80 (71%)	28/41 (68%)
<b>Farmaco utilizzato</b>	<b>infliximab (N; %)</b>	42/68 (62%)	15/80 (19%)	16/41 (39%)
	<b>etanercept (N; %)</b>	13/68 (19%)	37/80 (46%)	13/41 (32%)
	<b>adalimumab (N; %)</b>	13/68 (19%)	23/80 (29%)	11/41 (27%)
	<b>golimumab (N; %)</b>	0/68 (0%)	5/80 (6%)	1/41 (2%)

Legenda. SA, Spondilite Anchilosante; AP, artrite psoriasica; uSpA, spondiloartrite indifferenziata. DAS28 basale: disease activity score (28 articolazioni) al basale; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, scala 0-100. Le variabili numeriche sono espresse come media±deviazione standard.

## 4.2. Valutazione della risposta

La risposta per ciascun paziente è stata valutata a 6 mesi di trattamento ed all'ultimo follow-up utilizzando diversi indici di miglioramento a seconda del tipo di impegno clinico articolare prevalente:

- per valutare l'indice di attività di malattia nell'impegno prevalentemente assiale è stato utilizzato il questionario BASDAI. Esso valuta l'attività di malattia misurando su scala analogica visiva l'astenia, il dolore spinale e delle articolazioni periferiche, la rigidità mattutina<sup>266</sup> (Fig.7). I pazienti sono stati inclusi tra i responders in presenza di un miglioramento del BASDAI  $\geq$  al 50% o di almeno 2 punti su una scala da 0-10. Le linee guida ASAS per l'utilizzo dei farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  considerano la malattia attiva se il valore del BASDAI è pari o superiore a 4/10 (scala 0-10).
- nei soggetti che presentavano un impegno prevalentemente periferico abbiamo utilizzato i criteri EULAR, che prevedono il calcolo dell'indice composito di attività di malattia "DAS28" (Disease Activity Score per 28 articolazioni). Il DAS28 è un indice creato su basi statistiche che riunisce il numero di articolazioni dolenti, il numero di articolazioni tumefatte, la VES e l'attività globale di malattia utilizzando la seguente formula:

$$\text{DAS28(VES)} = 0,56\sqrt{(\text{TEN28})} + 0,28\sqrt{(\text{SW28})} + 0,70\ln(\text{VES}) + 0,014(\text{GH}) \quad \text{oppure}$$

$$\text{DAS28(PCR)} = 0,56\sqrt{(\text{TEN28})} + 0,28\sqrt{(\text{SW28})} + 0,36\ln(\text{PCR}+1) + 0,014(\text{GH}) + 0,96$$

dove

- TEN28= numero di articolazioni dolenti (da 0 a 28);
- SW28= numero di articolazioni tumefatte (da 0 a 28);
- $\ln(\text{VES})$ = logaritmo naturale della velocità di eritrosedimentazione;
- $\ln(\text{PCR})$ = logaritmo naturale della proteina C reattiva;
- GH= stato globale di salute o valutazione globale dell'attività di malattia da parte del paziente con scala analogica visiva di 100 mm.

Il DAS28 prende in considerazione la conta delle seguenti articolazioni di entrambi gli emisomi: scapolo-omeroale, gomito, polso, metacarpofalangee (1<sup>a</sup>–5<sup>a</sup>), interfalangee prossimali (1<sup>a</sup>–5<sup>a</sup>) e ginocchio.

Successivamente è stata valutata la risposta al trattamento mediante l'utilizzo dei criteri di risposta clinica EULAR come di seguito indicato.

La risposta è stata classificata:

- *buona*, quando si è ottenuto un miglioramento del DAS28 rispetto alla valutazione iniziale superiore a 1.2 e contemporaneamente un valore assoluto del DAS28 pari o inferiore a 3.2;
- *moderata*, quando la variazione del DAS28 rispetto alla valutazione iniziale si situava tra 0.6 e 1.2 ed il valore assoluto era  $\leq 5.1$ , oppure, nel caso in cui il valore assoluto del DAS28 fosse stato superiore a 5.1, la variazione del DAS28 doveva essere  $\geq 1.2$ ;
- *assente*, quando il valore assoluto superava 5.1 e la variazione del DAS28 era inferiore a 1.2 oppure, per qualsiasi valore assoluto di DAS28, quando la variazione era pari o inferiore a 0.6.

I criteri EULAR considerano l'artrite "attiva" con un DAS28 pari o superiore a 3.2.

**Fig.7: Questionario BASDAI**

---

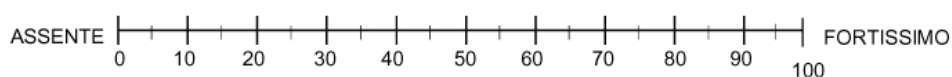
## **Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI)**

---

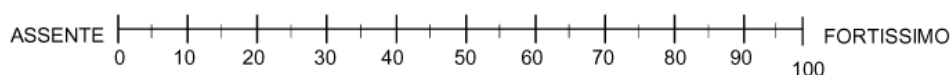
Vorremmo che Lei rispondesse a ciascuna domanda indicando la risposta con una crocetta sulla linea graduata da 0 a 100.

Tutte le domande si riferiscono a come si è sentito nell'ultima settimana

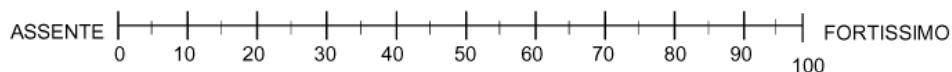
1. Come indicherebbe il grado di stanchezza e/o di affaticamento



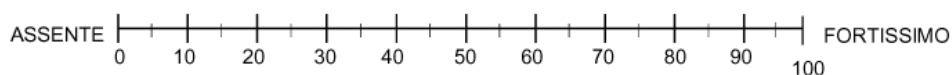
2. Come indicherebbe il grado di dolore che ha provato a livello del collo, della schiena e delle anche



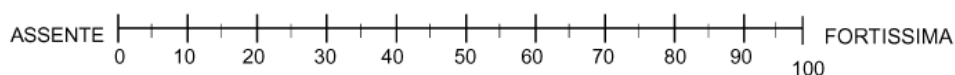
3. Come indicherebbe il grado di dolore che ha provato a livello delle altre articolazioni (escluse il collo, la schiena e le anche)



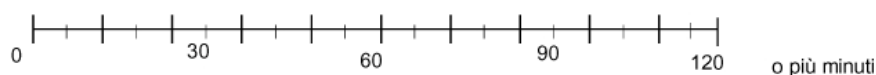
4. Come indicherebbe il fastidio che lei prova nei punti che risultano dolorosi al contatto o alla pressione



5. Come indicherebbe l'intensità della rigidità che Lei prova al risveglio



6. Qual è la durata della rigidità che Lei prova al risveglio (espressa in minuti)



Calcolo del BASDAI: sommare la media delle domande 5 e 6 alla somma delle domande da 1 a 4 e dividere il totale per 5 (scala 0-100)

### 4.3. Metodiche di biologia molecolare

L'analisi dei genotipi dei pazienti per i polimorfismi del TNF- $\alpha$  (-308A/G), del TNFR2 (196M/R), dell'Fc $\gamma$ RIIIA (158 V/F) è stata effettuata presso il laboratorio di Biologia cellulare e molecolare della Clinica di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine utilizzando le seguenti tecniche:

- estrazione del DNA genomico dal sangue periferico in EDTA con metodiche automatizzate (estrattore automatico Promega Maxwell 16 e kit dedicati);
- analisi dei polimorfismi biallelici mediante amplificazione PCR (polymerase chain reaction) e successiva digestione con specifici enzimi di restrizione (TNF- $\alpha$ , TNFR2) o sequenziamento genico diretto (Fc $\gamma$ RIIIA).

Tutti i pazienti arruolati nello studio hanno dato il loro consenso informato al prelievo di sangue periferico per le successive analisi genetiche.

#### 4.3.1. Analisi dei polimorfismi genici

##### *Polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$*

L'analisi del polimorfismo -308A/G del TNF- $\alpha$  è stata eseguita secondo metodiche precedentemente riportate (Lee *et al.*, Rheumatol Int 2006). In particolare, il programma di amplificazione PCR prevede le seguenti fasi:

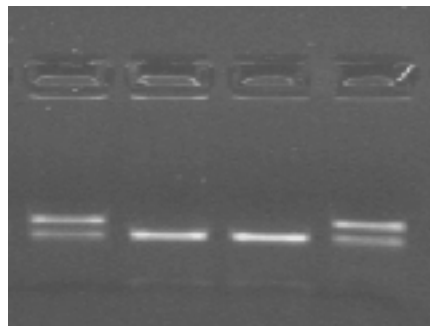
- denaturazione iniziale a 95°C 2 MIN
- |                 |             |   |          |
|-----------------|-------------|---|----------|
| ➤ denaturazione | 94°C 30 SEC | } | 35 cicli |
| ➤ annealing     | 60°C 30 SEC |   |          |
| ➤ sintesi       | 72°C 45 SEC |   |          |
- sintesi finale a 72°C 5 MIN

E' stata utilizzata la Taq MAXIMA HOT START DNA POLYMERASE della ditta FERMENTAS, la reazione è stata effettuata in 25µL totali. Le sequenze dei primers erano le seguenti:

-308TNF sense: GAGCAATAGGTTTTGAGCGCCAT

-308TNF antisense: GGGACACACAAGCATCAAG

Il prodotto dell'amplificazione è stato digerito con l'enzima NcoI (New England Biolabs) e la digestione è stata visualizzata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3.5% in TBE (Tris Borato EDTA, pH 7.4). Quando è presente l'allele G l'enzima taglia il frammento amplificato, mentre quando è presente l'allele A resta indigerito (fig.8).



**Figura 8: Pattern di digestione enzimatica per l'analisi del polimorfismo -308 del TNF alfa. Lanes 1, 4: genotipo AG; Lanes 2,3: genotipo GG.**

#### *Polimorfismo 196M/R del TNFRII*

L'analisi del polimorfismo 196M/R del TNFRII è stata effettuata grazie all'utilizzo di una PCR, seguita dalla digestione del prodotto amplificato con l'enzima di restrizione Nla III. Per l'esecuzione della PCR sono state utilizzate le seguenti condizioni:

primer sense: 5'-TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT- 3' ; 30 pmol/reaz

primer antisense: 5' – ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT- 3'; 30 pmol/reaz

quantità di DNA: 100 ng



dNTP

Taq DNA polimerasi (Promega): 5 U/reaz

concentrazione di  $MgCl_2$  1,5 mM

volume totale: 50 microlitri

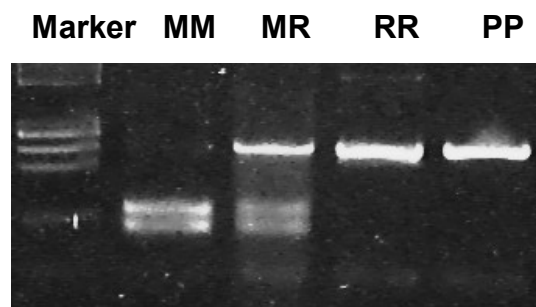
condizioni di amplificazione: Denaturazione iniziale: 5 minuti a 95°C

38 cicli { Denaturazione: 1 minuto a 95°C  
Annealing: 1 minuto a 57°C  
Estensione: 1 minuto a 72°C

Estensione finale: 5 minuti a 72°C

Mediante questa amplificazione si è ottenuto un frammento di 242 bp che è stato sottoposto a digestione per tre ore a 37° C con l'enzima Nla III. I frammenti così digeriti sono stati sottoposti a elettroforesi su gel d'agarosio al 2,5% in TBE, con etidio bromuro.

I diversi genotipi sono caratterizzati dai seguenti pattern di digestione: omozigote MM: due bande corrispondenti a due frammenti rispettivamente di 109 bp e 133 bp; eterozigote MR, costituito da tre bande corrispondenti rispettivamente ai frammenti di 109 bp, 133 bp e 242 bp; ed infine omozigote RR costituito da un'unica banda corrispondente al frammento di 242 bp (Fig.9).



**Figura 9: Pattern di digestione enzimatica per l'analisi del polimorfismo 196 M/R del TNFR2. Marker: phX Hae III; PP: prodotto della PCR non digerito.**

#### *Polimorfismo FcγRIIIA-158V/F*

Il polimorfismo 158V/F dell'FCGR3A è stato analizzato secondo la metodica riportata da Wang *et al.* (Chin Med J 2007;120(18):1606-1610) con alcune

modifiche. In particolare l'amplificazione genica si è avvalsa dei seguenti primers:

CD16 sense: CCCTTCACAAAGCTCTGCACT

CD16 antisense: ATTCTGGAGGCTGGTGCTACA

e del seguente programma di amplificazione:

➤ denaturazione iniziale a 94°C 2 MIN

➤ seguita da 9 cicli così composti:

denaturazione      94°C   20 SEC

annealing

primo ciclo a 60°C e i seguenti con riduzione di 0.5°C a ciclo fino a 55°C  
per 40 SEC

sintesi a 72°C 1 min e 30 sec

➤ e successivi 33 cicli così composti:

94°C 20 SEC

55°C 40 SEC

72°C 1'30 SEC

Sintesi finale a 72°C 5 MIN.

Il prodotto di PCR, di circa 850 bp, è stato purificato mediante kit QIAquick gel extraction (QIAGEN) (eluizione in 20/25µL) e quindi inviato a sequenziamento genico diretto mediante utilizzo del primer CD16 Seqnew (sequenza: CCCCAAAGAATGGACTGAA).

#### **4.4. Analisi statistica**

Le variabili categoriche sono state descritte in termini di frequenza relativa; le variabili continue sono state descritte mediante media±deviazione standard o mediana e range, in base al tipo di distribuzione della variabile, valutata mediante test di normalità (Kolmogorov-Smirnov). Il confronto delle caratteristiche tra sottogruppi di pazienti è stato fatto utilizzando i test chi-quadrato (o test esatto di Fisher, in base agli assunti) per le variabili categoriche e t-test o test di Mann-Whitney per le variabili continue, in base al tipo di distribuzione della variabile, valutata mediante test di normalità (Kolmogorov-Smirnov).

L'associazione tra genotipo e gli obiettivi dello studio è stata valutata mediante test chi-quadrato (o test esatto di Fisher, in base agli assunti). Quindi sono state eseguite analisi di regressione logistica univariata e multivariata, introducendo in queste ultime solo le variabili indipendenti che erano risultate statisticamente associate agli endpoint all'analisi univariata.

Di seguito verranno presentati i risultati relativi

- alla distribuzione di ogni singolo polimorfismo tra i pazienti e controlli;
- al confronto di ogni singolo polimorfismo con la risposta al trattamento anti-TNF- $\alpha$  e persistenza in trattamento con il primo farmaco biologico.

## Risultati

### 5.1. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$ in pazienti e controlli

Come illustrato nelle tabelle 7 e 8, la frequenza genotipica del polimorfismo -308A/G del TNF- $\alpha$  tende ad essere diversa nei pazienti con SpA rispetto a quella osservata nella popolazione sana di controllo, con una presenza più elevata dell'allele A (genotipi AG/AA) associato ad una maggiore espressione del TNF- $\alpha$  che tende alla significatività statistica nel gruppo dei pazienti considerato globalmente ( $p=0.07$ ) e nei sottogruppi di AP ( $p=0.08$ ) e uSpA ( $p=0.052$ ).

**Tabella 7. Distribuzione delle frequenze genotipiche del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  nei pazienti e controlli**

TNF $\alpha$ -308	SpA	CONTROLLI
Genotipo	N (%)	N (%)
AA	3/189 (2%)	1/130 (0,6%)
AG	37/189 (20%)	16/130 (12,4%)
GG	149/189 (78%)	113/130 (87%)

**Tabella 8. Distribuzione delle frequenze genotipiche del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  nei pazienti suddivisi in sottogruppi per patologia e controlli**

TNF $\alpha$ -308	SA	AP	uSpA	CONTROLLI
Genotipo	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
AA	1/68 (1%)	1/80 (1%)	1/41 (2%)	1/130 (0,6%)
AG	10/68 (15%)	17/80 (21%)	10/41 (25%)	16/130 (12,4%)
GG	57/68 (84%)	62/80 (78%)	30/41 (73%)	113/130 (87%)

## 5.2. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 196 M/R del TNFRII in pazienti e controlli

Come illustrato in tabella 9, nei pazienti con SpA la frequenza genotipica del polimorfismo 196 M/R del TNFRII non è risultata significativamente diversa rispetto a quella della popolazione sana di controllo. Non sono emerse differenze nella subanalisi effettuata stratificando i pazienti per patologia (SA, AP, uSpA).

**Tabella 9: Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 196 M/R del TNFRII nei pazienti e controlli**

TNFRII	PAZIENTI	CONTROLLI
Genotipo	N (%)	N (%)
MM	117/189 (62%)	57/84 (67,8%)
MR	67/189 (35%)	26/84 (31%)
RR	5/189 (3%)	1/84 (1,2%)

## 5.3. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 158 V/F dell'FcγRIIIA in pazienti e controlli

Nei pazienti con SpA la frequenza genotipica del polimorfismo 158V/F dell'FcγR3A non è risultata significativamente diversa rispetto a quella della popolazione sana di controllo (Tab. 10), anche se vi è una tendenza ad una maggiore frequenza dei genotipi VV/VF nel sottogruppo delle uSpA (p=0.08) (Tab. 11). Si segnala che è stato possibile genotipizzare per tale polimorfismo 181/189 pazienti.

**Tabella 10. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo FcγRIIIA (158 V/F) nei pazienti e controlli**

FCγRIIIA	SpA	CONTROLLI
Genotipo	N (%)	N (%)
VV	36/181 (20%)	24/130 (19%)
VF	96/181 (53%)	60/130 (46%)
FF	49/181 (27%)	46/130 (35%)

**Tabella 11. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo Fc $\gamma$ RIIIA (158 V/F) nei pazienti suddivisi in sottogruppi per patologia e controlli**

FC $\gamma$ RIIIA	SA	AP	uSpA	CONTROLLI
Genotipo	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
VV	15/65 (23%)	12/76 (16%)	9/40 (23%)	24/130 (19%)
VF	34/65 (52%)	39/76 (51%)	23/40 (57%)	60/130 (46%)
FF	16/65 (25%)	25/76 (33%)	8/40 (20%)	46/130 (35%)

#### **5.4. Polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$ e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ al mese +6, all'ultimo follow-up e persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$**

Si segnala che le analisi sulle correlazioni tra i polimorfismi e la risposta clinica a 6 mesi sono state effettuate su 188/189 pazienti per i polimorfismi -308 A/G del TNF- $\alpha$  e 196 M/R del TNFRII e su 180/189 pazienti per il polimorfismo Fc $\gamma$ RIIIA (missing data: risposta clinica di un paziente con AP e genotipo del polimorfismo Fc $\gamma$ RIIIA di 8 pazienti). I confronti tra switchers e non-switchers sono stati effettuati su 181/189 pazienti per il polimorfismo Fc $\gamma$ RIIIA e su 189/189 per i restanti due polimorfismi.

Il polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  non è risultato associato alla risposta clinica al mese +6 (Tab. 12) ed all'ultimo follow-up (Tab.13). Suddividendo i pazienti per impegno clinico (prevalentemente assiale vs periferico) e patologia (SA, AP, uSpA) non si sono osservate associazioni statisticamente significative tra il suddetto polimorfismo e la risposta.

**Tabella 12. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  nei pazienti responsivi (R) e non responsivi (NR) al trattamento con anti-TNF al mese +6**

	TNF- $\alpha$ -308A/G		
Risposta mese +6	AA	AG	GG
NR	1 (33,3%)	5 (13,5%)	28 (18,9%)
R	2 (66,7%)	32 (86,5%)	120 (81,1%)
Totale	3 (100%)	37 (100%)	148 (100%)

**Tabella 13. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  nei pazienti responsivi (R) e non responsivi (NR) al trattamento con anti-TNF all'ultimo follow-up**

	TNF- $\alpha$ -308A/G		
Risposta ultimo F-U	AA	AG	GG
NR	1 (50%)	2 (5,9%)	20 (15,3%)
R	1 (50%)	32 (94,1%)	111 (84,7%)
Totale	2 (100%)	34 (100%)	131 (100%)

Successivamente abbiamo analizzato il gruppo di pazienti che persiste in trattamento col primo anti-TNF- $\alpha$  (che denomineremo non switchers, N-Sw) confrontandolo con il gruppo di pazienti che aveva già fallito in precedenza almeno 1 farmaco biologico anti-TNF- $\alpha$  (ovvero gli switchers, Sw). I due gruppi non presentavano differenze statisticamente significative nella distribuzione per età, durata di malattia, BASDAI basale, sesso, positività HLA-B27.

Il gruppo dei N-Sw presentava una durata di terapia maggiore ( $p < 0.0001$ ; 48 mesi, 6-116 vs. 24 mesi, 6-96) rispetto al gruppo degli switchers(Sw).

La distribuzione genotipica dei NSw vs Sw in relazione al polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  è risultata la seguente: AA 66.7% vs 33.3%, AG 91.9% vs 8.1%, GG 69.8% vs 30.2% ( $p = 0.009$ ) (Tab.14), osservando un'associazione statisticamente significativa tra il genotipo AA/AG vs GG e l'appartenenza al gruppo dei NSw ( $p = 0.01$ ; OR 3.9; 95%IC 1.3-11.6) (Tab.15).

**Tabella 14. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  nei pazienti Switchers (Sw) e non switchers (N-Sw)**

	TNF- $\alpha$ -308A/G		
	AA	AG	GG
N-Sw	2 (66,7%)	34 (91,9%)	104 (69,8%)
Sw	1 (33,3%)	3 (8,1%)	45 (30,2%)
Totale	3 (100%)	37 (100%)	149 (100%)

\* p= 0,009

**Tabella 15. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo -308 A/G del TNF- $\alpha$  nei pazienti Switchers (Sw) e non switchers (N-Sw)**

	TNF- $\alpha$ -308A/G	
	AA/AG	GG
N-Sw	36 (90%)	104 (69,8%)
Sw	4 (10%)	45 (30,2%)
Totale	40 (100%)	149 (100%)

\* p= 0.01

Tra gli ulteriori parametri possibilmente implicati nella persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$  abbiamo valutato l'età, il sesso, la durata della malattia, durata della terapia, l'impegno clinico prevalente (assiale vs periferico), il sottogruppo di malattia (SA, AP, uSpA), la positività per HLA-B27, l'utilizzo del tipo di farmaco biologico (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab).

All'analisi univariata è emersa un'associazione tra l'appartenenza al gruppo N-Sw ed i seguenti parametri: sesso maschile (p= 0.003; OR 2.8 IC 1.4-5.4), utilizzo di infliximab (p=0,002; OR 3.2; IC 1.5-6.9) e durata della terapia (p=<0.0001; OR 0.97; 0.95-0.98), mentre non si sono osservate associazioni statisticamente significative con l'età (p=0.35), durata di malattia (p=0.53), l'impegno clinico prevalente (p=0.19), diagnosi di SA (p=0.11), AP (p=0.45), uSpA (p=0.34), positività HLA-B27 (p=0.39), utilizzo di adalimumab (p=0.33), etanercept (0.56), golimumab (quest'ultimo parametro non valutabile per l'esiguo numero di casi).

L'associazione precedentemente descritta tra il genotipo AA/AG vs GG e l'appartenenza al gruppo dei NSw veniva confermata all'analisi multivariata (p=0.004; OR=5.5; IC 1.7-17.9).



## 5.5. Polimorfismo 196 M/R del TNFRII e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ al mese +6, all'ultimo follow-up e persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$

Come illustrato nelle rispettive tabelle, il polimorfismo 196 M/R del TNFRII non è risultato associato alla risposta clinica al mese +6 (Tab.16), all'ultimo follow-up (Tab.17) né all'appartenenza al gruppo dei N-Sw (Tab.18). Suddividendo i pazienti per impegno clinico (prevalentemente assiale vs periferico) e patologia (SA, AP, uSpA) non si sono osservate associazioni statisticamente significative tra il suddetto polimorfismo e la risposta.

**Tabella 16. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 196M/R del TNFRII nei pazienti responsivi (R) e non responsivi (NR) al trattamento con anti-TNF al mese +6**

	TNFRII 196M/R		
Risposta mese +6	MM	MR	RR
NR	16 (13,8%)	18 (26,9%)	0 (0%)
R	100 (86,2%)	49 (73,1%)	5 (100%)
Totale	116 (100%)	67 (100%)	5 (100%)

**Tabella 17. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 196M/R del TNFRII nei pazienti responsivi (R) e non responsivi (NR) al trattamento con anti-TNF all'ultimo follow-up**

	TNFRII 196M/R		
Risposta ultimo F-U	MM	MR	RR
NR	18 (17,1%)	5 (8,8%)	0 (0%)
R	87 (82,9%)	52 (91,2%)	5 (100%)
Totale	105 (100%)	57 (100%)	5 (100%)

**Tabella 18. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 196M/R del TNFRII nei pazienti Switchers (Sw) e non switchers (N-Sw)**

	TNFRII 196M/R		
	MM	MR	RR
N-Sw	90 (76,9%)	47 (70,1%)	3 (60%)
Sw	27 (23,1%)	20 (29,9%)	2 (40%)
Totale	117 (100%)	67 (100%)	5 (100%)

## 5.6. Polimorfismo 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA e risposta clinica agli inibitori del TNF- $\alpha$ al mese +6, all'ultimo follow-up e persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$

Il polimorfismo Fc $\gamma$ RIIIA non è risultato associato alla risposta clinica al mese +6 (Tab.19), all'ultimo follow-up (Tab.20) né all'appartenenza al gruppo dei N-Sw (Tab.21). Suddividendo i pazienti per impegno clinico (prevalentemente assiale vs periferico) e patologia (SA, AP, uSpA) non si sono osservate associazioni statisticamente significative tra il suddetto polimorfismo e la risposta.

**Tabella 19. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 158V/F dell' Fc $\gamma$ RIIIA nei pazienti responsivi (R) e non responsivi (NR) al trattamento con anti-TNF al mese +6**

	Fc $\gamma$ RIIIA 158V/F		
Risposta mese +6	FF	VF	VV
NR	7 (14,6%)	18 (18,8)	6 (16,7%)
R	41 (85,4%)	78 (81,2%)	30 (83,3%)
Totale	48 (100%)	96 (100%)	36 (100%)

**Tabella 20. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 158V/F dell' Fc $\gamma$ RIIIA nei pazienti responsivi (R) e non responsivi (NR) al trattamento con anti-TNF all'ultimo follow-up**

	Fc $\gamma$ RIIIA 158V/F		
Risposta ultimo F-U	FF	VF	VV
NR	5 (12,2%)	14 (16,1%)	4 (11,8%)
R	36 (87,8%)	73 (83,9%)	30 (88,2%)
Totale	41 (100%)	87 (100%)	34 (100%)

**Tabella 21. Distribuzione dei genotipi del polimorfismo 158V/F dell' Fc $\gamma$ RIIIA nei pazienti Switchers (Sw) e non switchers (N-Sw)**

	Fc $\gamma$ RIIIA 158V/F		
	FF	VF	VV
N-Sw	37 (75,5%)	73 (76%)	26 (72,2%)
Sw	12 (24,5%)	23 (24%)	10 (27,8%)
Totale	49 (100%)	96 (100%)	36 (100%)

## 6

### Discussione

Le spondiloentesoartriti sieronegative colpiscono spesso soggetti giovani e, se non adeguatamente trattate, possono portare ad un severo grado di disabilità, con conseguenti notevoli problemi di gestione e sovraccarico della spesa sanitaria. Il trattamento richiede una diagnosi precoce ed un tempestivo inizio della terapia quanto più possibile mirata al fine di ridurre il danno articolare e limitare la perdita funzionale.

Nell'ultimo decennio sono stati fatti notevoli progressi sia in ambito diagnostico che terapeutico. L'utilizzo di tecniche di imaging capaci di visualizzare l'infiammazione articolare attiva sia a livello assiale (con l'utilizzo della RMN per la ricerca dell'edema osseo alle articolazioni sacroiliache) che periferico (con l'uso dell'ecografia articolare e della RMN) ha permesso il successivo sviluppo dei nuovi criteri classificativi per le forme precoci di SpA ad impegno assiale e periferico. I farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  sono entrati a far parte dell'armamentario terapeutico delle SpA e, grazie alla possibilità di diagnosticare le forme assiali in fase pre-radiografica, tali farmaci possono ora essere utilizzati più precocemente nel decorso della malattia con efficacia pari- se non superiore, a quella dimostrata in precedenza nei pazienti con SpA assiale radiografica che soddisfacevano i criteri di New York modificati.

Nonostante queste premesse, tuttora circa il 30% dei pazienti non risponde o risponde in maniera inadeguata agli anti-TNF- $\alpha$  e all'incirca il 15% dei pazienti per anno inizialmente responsivi interrompe la terapia per perdita di risposta, comparsa di effetti collaterali o mancata compliance al trattamento.

Ai fini di una migliore comprensione patogenetica e, conseguentemente, di un'evoluzione dell'approccio terapeutico verso una terapia quanto più possibile mirata per il singolo individuo è stato implementato l'utilizzo di tecniche analitiche quali il dosaggio citochinico e le analisi genetiche. In tal senso la genetica e la farmacogenomica rivestono un ruolo fondamentale nell'identificazione rispettivamente di fattori predittivi di suscettibilità allo sviluppo di una determinata malattia o prognostici e di fattori predittivi di risposta alla terapia per indirizzare

l'approccio terapeutico ottimale data la sempre più ampia schiera di farmaci offerta dal mercato farmaceutico.

Nel presente studio multicentrico sono stati valutati 189 pazienti con spondiloartrite sieronegativa (di cui 68 con spondilite anchilosante, 80 con artrite psoriasica e 41 con spondiloartrite indifferenziata), di cui 115 con impegno prevalentemente assiale. Tra i marcatori genetici possibilmente implicati nella risposta agli agenti anti-TNF- $\alpha$  abbiamo individuato i seguenti polimorfismi: -308 A/G del TNF- $\alpha$ , 196 M/R del TNFR2 e 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA.

Da una prima analisi genetica non sono emerse significative associazioni tra i suddetti polimorfismi e la suscettibilità allo sviluppo delle spondiloartriti, anche se abbiamo osservato una maggiore prevalenza dei genotipi AA/AG del polimorfismo -308A/G del TNF- $\alpha$  nel gruppo dei pazienti rispetto ai controlli. Tale prevalenza allelica tende alla significatività statistica nel sottogruppo di pazienti affetti da uSpA e AP, mentre non è stata riscontrata alcuna associazione nel sottogruppo di pazienti con SA.

Questo dato è in linea con quanto riportato in letteratura dalle 3 meta-analisi sulla SA<sup>207,208,209</sup> (che dimostrano la mancata associazione del polimorfismo con tale malattia), e da 2 studi precedenti sulle uSpA<sup>204,205</sup>, nei quali si segnalava un'associazione tra l'allele A e lo sviluppo della uSpA. Il gruppo di pazienti qui analizzati è in realtà costituito da pazienti con una malattia severa, non responsiva alle terapie di base, pertanto non possiamo concludere che tale allele si associ alla malattia in generale, ma che sia piuttosto coinvolto nella sua severità: la presenza tendenzialmente più elevata dell'allele A nel sottogruppo di pazienti con AP associata ad una maggiore espressione del TNF- $\alpha$  potrebbe indicare una malattia più severa, in accordo con le conclusioni di un recente lavoro del gruppo di Balding<sup>210</sup>, in cui è stato analizzato questo polimorfismo nell'AP.

A differenza di quanto riportato in 2 studi precedenti sulla SA<sup>247,248</sup>, nel nostro lavoro non abbiamo osservato differenze nella distribuzione genotipica del TNFR2 rispetto ai controlli sia nell'intero gruppo di SpA che nei rispettivi sottogruppi di malattia (SA, AP, uSpA). Infine, per quanto concerne il polimorfismo 158V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA, abbiamo osservato una tendenza ad una maggiore frequenza genotipica VV/VF solo nei pazienti con uSpA ma non nei rimanenti

sottogruppi o nelle SpA in generale. Non esistono ad oggi studi in letteratura sulla suscettibilità di tale polimorfismo nelle SpA.

Alla successiva valutazione farmacogenetica non sono emerse significative associazioni tra i singoli polimorfismi -308 A/G del TNF- $\alpha$ , 196 M/R del TNFRII e 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA e la risposta al trattamento con i farmaci anti-TNF- $\alpha$  al mese +6 nè all'ultimo follow-up. Tale dato veniva riprodotto anche dopo aver suddiviso i pazienti in base all'impegno clinico prevalente (assiale vs periferico) e patologia (SA, AP, uSpA). La suddivisione per impegno clinico era stata ideata essendo nota la diversa strategia terapeutica comunemente adottata nei due gruppi, che prevede il passaggio diretto dai FANS all'utilizzo del farmaco biologico nell'impegno assiale e l'utilizzo di uno o più DMARDs prima dell'anti-TNF- $\alpha$  nei pazienti con prevalente artrite periferica.

Andando però a rivalutare le risposte nei singoli casi, abbiamo osservato in diversi pazienti classificati come non responders al mese +6 una persistenza in trattamento a lungo termine con lo stesso anti-TNF- $\alpha$ . Questo dato rispecchia quanto già segnalato negli ultimi anni in letteratura, ovvero la carenza degli attuali indici di attività di malattia suggeriti dalle linee guida nel valutare efficacemente la risposta al trattamento sia nell'impegno prevalentemente assiale che periferico delle SpA. In tal senso è importante sottolineare come un elevato indice BASDAI da solo non sia in grado di dimostrare l'origine infiammatoria dei sintomi lamentati dal paziente – condizione necessaria per ottenere una buona risposta all'anti-TNF- $\alpha$  – risultando incrementato anche in altre condizioni cliniche spesso associate alle SpA, quali ad esempio la fibromialgia, oppure nei casi in cui vi è un danno strutturale evoluto. Questo è il motivo principale per cui anche nelle ultime linee-guida ASAS sull'avvio degli anti-TNF- $\alpha$  nella SpA assiale non è sufficiente il criterio dell'elevata attività di malattia definita dal valore BASDAI  $\geq 4$  (scala 1-10), ma è richiesto anche il parere favorevole del reumatologo esperto riguardo alla candidabilità o meno del paziente per tale trattamento. Per il corretto indirizzo terapeutico vanno considerati infatti non solo i dati soggettivi del paziente ma anche i segni obiettivabili di attività di malattia attraverso l'esecuzione dell'esame obiettivo, la valutazione dei parametri umorali (incremento degli indici di flogosi) e

la presenza di infiammazione attiva mediante le nuove tecniche di imaging (RMN per l'impegno assiale, ecografia e RMN per l'impegno periferico).

Similmente, anche l'utilizzo del DAS28 per la valutazione dell'impegno periferico nelle SpA spesso non rispecchia la reale attività di malattia del paziente e di conseguenza la risposta al trattamento. Tale indice composito era stato inizialmente creato e validato per essere utilizzato nell'artrite reumatoide, malattia che si diversifica dalle SpA per il tipo di impegno articolare periferico (poliarticolare simmetrico nel primo caso, oligoarticolare asimmetrico ed a carico degli arti inferiori nel secondo).

E' verosimile che con l'avvento dei nuovi criteri classificativi per la SpA assiale e periferica vengano a breve ridefinite le linee-guida per la valutazione della risposta al trattamento.

Considerando questi limiti abbiamo introdotto nello studio un ulteriore parametro di valutazione, ovvero la persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$ , riflettendo tale dato in modo indiretto l'efficacia del farmaco a lungo termine nonché il ruolo del TNF- $\alpha$  nel sostenere l'infiammazione. I pazienti sono stati quindi suddivisi in due gruppi: 1) switchers (Sw  $\rightarrow$  pazienti che avevano fallito in precedenza almeno un anti-TNF- $\alpha$ ) e 2) non-switchers (N-Sw  $\rightarrow$  pazienti anti-TNF- $\alpha$  naïve).

Il gruppo dei N-Sw si differenziava in maniera significativa dal gruppo degli Sw per la durata di terapia maggiore. Procedendo al confronto dei due gruppi con i singoli polimorfismi è emersa un'associazione statisticamente significativa tra il genotipo AA/AG vs GG del polimorfismo del promotore -308 del TNF- $\alpha$  e l'appartenenza al gruppo dei NSw. Tra gli ulteriori parametri possibilmente implicati nella persistenza in trattamento con il primo anti-TNF- $\alpha$  sono state riscontrate quali variabili associate in maniera indipendente al gruppo dei NSw il sesso maschile, l'utilizzo di infliximab, la durata della terapia, mentre non si sono osservate associazioni statisticamente significative con l'età, la durata di malattia, l'impegno clinico prevalente, la diagnosi di SA, AP, uSpA, la positività HLA-B27, l'utilizzo degli altri anti-TNF- $\alpha$ . All'analisi di regressione logistica multivariata dei parametri risultati significativi all'analisi univariata permaneva l'associazione

genotipica precedentemente descritta a conferma della significatività del dato ottenuto e della natura multifattoriale di tale patologia.

Il genotipo AA/AG del polimorfismo del promotore -308 del TNF- $\alpha$  può rappresentare un biomarcatore genetico di persistenza in trattamento nel lungo termine col primo anti-TNF- $\alpha$  utilizzato per trattare le SpA. Tale polimorfismo potrebbe identificare un sottogruppo di pazienti in cui il TNF- $\alpha$  svolge un ruolo dominante nella patogenesi della malattia: la presenza dell'allele A era stata infatti precedentemente correlata ad un'aumentata produzione di TNF- $\alpha$ <sup>190</sup>.

I limiti principali dello studio sono rappresentati da un lato dalla relativamente piccola numerosità campionaria, che riduce la potenza dello studio, dall'altro dalla mancata parallela analisi dei processi molecolari di trascrizione e traduzione dei geni esaminati per poter confermare l'influenza del polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  sui livelli di mRNA e delle proteine codificate.

Nel presente lavoro, inoltre, non è stato possibile effettuare il dosaggio degli ADAbs (anticorpi anti-farmaco) e delle concentrazioni seriche dell'anti-TNF- $\alpha$ . La presenza degli ADAbs è stata recentemente correlata con la riduzione dei livelli serici del farmaco e l'inefficacia/perdita di risposta o comparsa di eventi avversi a seguito della somministrazione degli anti-TNF- $\alpha$ . Tuttavia, dai dati riportati nei diversi studi emerge una considerevole variabilità dell'incidenza degli ADAbs e non è ancora noto il reale valore predittivo del dosaggio serico dell'anti-TNF- $\alpha$  e degli stessi anticorpi anti-farmaco. Questo è in gran parte attribuibile ai diversi metodi di analisi utilizzati, ma può dipendere anche dal timing di raccolta dei campioni da analizzare, dall'eventuale uso concomitante dei DMARDs e da altre caratteristiche biologiche individuali quali ad esempio la durata e severità di malattia. Appare verosimile che con la standardizzazione dei metodi di analisi e la definizione del valore predittivo degli ADAbs il dosaggio di tali anticorpi diventi un importante strumento decisionale nella pratica clinica. La ricerca degli ADAbs dovrà pertanto essere inserita nei futuri studi di farmacogenetica per migliorare la selezione dei pazienti ed interpretazione dei risultati ottenuti.

A differenza del nostro studio, l'unico lavoro attualmente pubblicato sul possibile ruolo predittivo del polimorfismo -308 del TNF- $\alpha$  nella risposta ai farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$  nei pazienti con SpA aveva dimostrato un'associazione tra

l'allele A e una peggiore risposta agli anti-TNF- $\alpha$ . Tuttavia, lo studio di Seitz<sup>223</sup> differisce dal nostro lavoro per due aspetti sostanziali: la ridotta numerosità campionaria e la differente modalità di valutazione della risposta terapeutica.

Più specificatamente, nel lavoro di Seitz sono stati arruolati in totale 86 pazienti, di cui la maggior parte con artrite reumatoide e solamente 32 con SpA (22 spondiliti anchilosanti e 10 artriti psoriasiche).

Inoltre, nel valutare la risposta al trattamento, a differenza del nostro studio, in cui abbiamo utilizzato dei criteri di risposta clinica standardizzati (BASDAI50 per l'impegno assiale ed i criteri di risposta EULAR per l'impegno articolare periferico), Seitz et al ha categorizzato i pazienti con SA in good-moderate-non responders in base alla riduzione del BASDAI rispetto al basale:  $\geq 50\%$  (good responders),  $\leq 50\% - \geq 20\%$  (moderate),  $\leq 20\%$  (non-responders) ed i pazienti con AP utilizzando come cut-off il delta DAS28 (6 mesi vs basale):  $> 2.2$  (good-responders),  $\geq 1.2$  e  $\leq 2.2$  (moderate-responders),  $< 1.2$  (non-responders).

In base alle analisi effettuate non abbiamo riscontrato un'influenza del polimorfismo 158 V/F dell'Fc $\gamma$ RIIIA sulla risposta clinica agli anti-TNF- $\alpha$ . In un precedente lavoro di Morales-Lara et al<sup>263</sup> era emersa un'associazione statisticamente significativa tra il genotipo VV/VF ed una migliore risposta all'infliximab nei pazienti con SA, mentre non si erano osservate differenze nel gruppo dell'AP. Tali differenze non sono state confermate dal nostro studio alle successive subanalisi dei pazienti dopo averli suddivisi in sottogruppi secondo patologia (SA, AP, uSpA), impegno clinico (assiale vs periferico) o switchers-naïve. Anche in questo caso i due lavori si differenziano per numerosità campionaria (189 vs 49) e modalità di valutazione della risposta per l'impegno assiale (BASDAI vs BASFI, nel nostro studio e nel lavoro pubblicato da Morales-Lara et al, rispettivamente).

Dall'analisi del polimorfismo 196 M/R del TNFRII non sono emerse differenze significative nella distribuzione dei genotipi in relazione alla risposta al farmaco biologico anti-TNF- $\alpha$ .

L'aver distinto i pazienti in anti-TNF- $\alpha$ -naïve e switchers rappresenta sicuramente un aspetto innovativo del presente studio, se messo in relazione con



tutti gli studi di farmacogenetica pubblicati finora in letteratura, tanto nelle SpA quanto in altre patologie autoimmuni ad interessamento articolare.

Nel campo della patogenesi, le ultime ricerche hanno condotto alla scoperta di nuovi targets terapeutici nelle SpA, quali le cellule appartenenti all'immunità innata e le citochine IL-23 e l'IL-17. I dati preliminari suggeriscono un'efficacia terapeutica degli antagonisti dell'IL-17 nelle SpA<sup>26</sup>. Tali farmaci potrebbero rappresentare una valida alternativa nei pazienti non responsivi agli anti-TNF- $\alpha$ , nei quali è stato recentemente evidenziato un incremento dei Th17 circolanti e dei valori serici di IL-17 e IL-23<sup>30</sup>.

Per quanto concerne l'immunità adattativa, vi sono iniziali evidenze cliniche che supportano, almeno in un sottogruppo di pazienti, l'ipotesi di un coinvolgimento dei linfociti B nella patogenesi della malattia<sup>24</sup>, mentre andrà sicuramente chiarito il ruolo delle cellule Th17 nelle SpA mediante futuri trials clinici con farmaci diretti contro tali cellule.

Alla luce di questi dati quanto emerso nel presente studio assume ancora maggiore rilevanza, rappresentando il genotipo AA/AG del polimorfismo del promotore -308 del TNF- $\alpha$  un possibile biomarcatore genetico di un sottogruppo di pazienti in cui la malattia è particolarmente dipendente dal TNF- $\alpha$  ("TNF $\alpha$ -driven") e che necessitano, di conseguenza, di un trattamento a lungo termine con gli inibitori del TNF- $\alpha$ .

## Conclusioni

Il presente studio, pur con il limite di una ridotta numerosità campionaria, ci ha permesso di evidenziare un'associazione significativa tra il polimorfismo del TNF- $\alpha$  (-308) e le altre variabili cliniche indipendenti (sesso maschile, utilizzo di infliximab) con la persistenza in trattamento con il primo farmaco biologico anti-TNF- $\alpha$ .

Il riscontro di una correlazione tra tale polimorfismo e l'efficacia terapeutica del farmaco biologico utilizzato nei pazienti anti-TNF- $\alpha$  naïve enfatizza il ruolo di futuri studi di farmacogenomica volti ad individuare nuovi markers genetici predittivi di risposta differenziale agli anti-TNF- $\alpha$  per ottimizzare l'uso di tali farmaci nella pratica clinica, nonché di studi di genetica molecolare per chiarire i complessi meccanismi patogenetici di malattie multifattoriali quali le spondiloentesoartriti sieronegative.

Ulteriori studi su più ampia casistica sono tuttora in corso per confermare i risultati finora ottenuti.

## Bibliografia

- <sup>1</sup> Sieper J, Braun J. New treatment strategies in ankylosing spondylitis: Proceedings of the Ankylosing Spondylitis Workshop, Berlin, Germany, 18-19 January 2002. *Ann Rheum Dis*. 2002 Dec;61 Suppl 3:1-2.
- <sup>2</sup> Brewerton DA et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 1973;1:904-7
- <sup>3</sup> Brown MA et al. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann Rheum Dis* 1996;55:268-70
- <sup>4</sup> Reveille JD. The genetic basis of spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2004;6:117-25
- <sup>5</sup> Ramos M et al. Differential association of HLA-B\*2705 and B\*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J Biol Chem* 2002;277:28749-56
- <sup>6</sup> Rahman P et al. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(suppl 2):ii 37-9
- <sup>7</sup> Sims AM et al. Genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr Mol Med* 2004;4:13-20
- <sup>8</sup> Roddis M et al. Fully functional HLA B27-restricted CD4+ as well as CD8+ T cell responses in TCR transgenic mice. *J Immunol* 2004;172:155-61
- <sup>9</sup> Hammer RE et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990; 63:1099–1112.
- <sup>10</sup> Hermann E et al. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993; 342:646–650.
- <sup>11</sup> Ebringer A et al. Molecular mimicry; the geographical distribution of immune responses to Klebsiella in ankylosing spondylitis and its relevance to therapy. *Clin Rheumatol* 1996;15(suppl 1):57-61
- <sup>12</sup> Rehakova Z et al. Germ-free mice do not develop ankylosing enthesopathy, a spontaneous joint disease. *Hum Immunol* 2000;61:555-8
- <sup>13</sup> May E, Dorris ML, Satumtira N, et al. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 2003; 170:1099–1105.
- <sup>14</sup> Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, et al. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1977–1984.

- 
- <sup>15</sup> Gaston JS, Goodall JC, Baeten D. Interleukin-23: a central cytokine in the pathogenesis of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63:3668–3671.
- <sup>16</sup> Pointon JJ, et al. The chromosome 16q region associated with ankylosing spondylitis includes the candidate gene tumour necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD). *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1243–1246.
- <sup>17</sup> Sims AM, et al. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1305–1309.
- <sup>18</sup> Baeten D et al. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R359-69.
- <sup>19</sup> Krutthof E et al. Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R569-80.
- <sup>20</sup> Ambarus C et al. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:351-358
- <sup>21</sup> Danning CL et al. Macrophage-derived cytokine and nuclear factor kappaB p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1244-56
- <sup>22</sup> Braun J et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995;38:499-505.
- <sup>23</sup> Ferraccioli G et al. Should we consider tumor necrosis factor as the only target in spondyloarthritides? *J of Rheum* 2012; 39 (S89):94-96.
- <sup>24</sup> Song IH, Heldmann F, Rudwaleit M, et al. Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-four-week clinical trial. *Arthritis Rheum* 2010;62:1290 – 7.
- <sup>25</sup> Song IH et al, One-year follow-up of ankylosing spondylitis patients responding to rituximab treatment and re-treated in case of a flare. *Ann Rheum Dis* 2012 Aug 11 (epub ahead of print)
- <sup>26</sup> Baeten D, Sieper J, Emery P, Braun J. The anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) showed good safety and efficacy in the treatment of active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010; 62:2840–2841.
- <sup>27</sup> Appel H, et al. Analysis of IL-17 $\gamma$  cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther* 2011; 13:R95.
- <sup>28</sup> Moran EM, et al. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One* 2011; 6:e24048

- 
- <sup>29</sup>Noordenbos T, Yermenko N, Gofita I, et al. IL-17 positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64:99–109.
- <sup>30</sup>Xueyi L et al. Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF- $\alpha$  therapy. *J Clin Immunol* 2012 Aug 29 (epub ahead of print).
- <sup>31</sup>McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med* 2006; 3:e297.
- <sup>32</sup>Ritchlin CT et al. Mechanisms of TNF-alpha and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003;111:821-31.
- <sup>33</sup>Wanders A et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:1756-1765
- <sup>34</sup>van der Heijde D et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008;58:1324-1331.
- <sup>35</sup>van der Heijde D et al. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2008;58:3063-3070.
- <sup>36</sup>van der Heijde D et al. Adalimumab (HUMIRA<sup>®</sup>) therapy for Ankylosing spondylitis over 2 years does not demonstrate inhibition of radiographic progression compared with a historical control group. *Arthritis Rheum* 2008;58:S413.
- <sup>37</sup>Diarra D et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodelling. *Nat Med* 2007;13:156-163.
- <sup>38</sup>Bonewald LF et al. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signalling. *Bone* 2008;42:606-615.
- <sup>39</sup>Tracey KJ et al. Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 1994;45:491-503
- <sup>40</sup>Newton RC et al. Biology of TACE inhibition. *Ann Rheum Dis* 2001;60: iii25-iii32
- <sup>41</sup>Bemelmans MHA et al. Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model. *J Immunol*. 1993;150:2007-17
- <sup>42</sup>Aderka D et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992;175:323-29
- <sup>43</sup>Vassalli P et al. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 1992 ;10:411-52
- <sup>44</sup>Collart MA et al. TNF- $\alpha$  gene expression in macrophages: regulation by NF- $\kappa$ B is independent of c-Jun or C/EBP  $\beta$ . *J Immunol* 2000;164: 4277-4285

- 
- <sup>45</sup> Collart MA et al. Regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  transcription in macrophages: involvement of four  $\kappa$ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 1990;10: 1498-506
- <sup>46</sup> Beutler B et al. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol* 1999;26 (Suppl):16-21
- <sup>47</sup> De Rycke L et al. Tumor necrosis factor alpha blockade treatment down-modulates the increased systemic and local expression of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum* 2005;52:2146-58.
- <sup>48</sup> Moll JM et al. Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behçet syndrome. *Medicine* 1974;53:343-64.
- <sup>49</sup> Dougados M et al. The European Spondyloarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of Spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1218-1227
- <sup>50</sup> Boyer GS et al. Evaluation of the European Spondyloarthropathy Study Group preliminary classification criteria in Alaskan Eskimo populations. *Arthritis Rheum* 1993;36:534-8.
- <sup>51</sup> Cury SE et al. Evaluation of the European Spondyloarthropathy Study Group (ESSG) preliminary classification criteria in Brazilian patients. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:79-82.
- <sup>52</sup> Amor B et al. Criteria of the classification of spondyloarthropathies. *Rev Rhum (Fr)* 1990;57:85-9.
- <sup>53</sup> Van Tubergen et al. Diagnosis and classification in spondyloarthritis: identifying a chameleon. *Nat.Rev.Rheumatol* 2012; 8:253-261
- <sup>54</sup> Van der Linden S et al. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984;27:361-8.
- <sup>55</sup> Braun J et al. Use of dynamic magnetic resonance imaging with fast imaging in the detection of early and advanced sacroiliitis in spondyloarthropathy patients. *Arthritis Rheum* 1994;37:1039-45.
- <sup>56</sup> Oostveen J et al. Early detection of sacroiliitis on magnetic resonance imaging and subsequent development of sacroiliitis on plain radiography. A prospective, longitudinal study. *J Rheumatol* 1999;26:1953-8.
- <sup>57</sup> Bennett AN et al. Severity of baseline magnetic resonance imaging-evident sacroiliitis and HLA-B27 status in early inflammatory back pain predict radiographically evident ankylosing spondylitis at eight years. *Arthritis Rheum* 2008;58:3413-18.
- <sup>58</sup> Rudwaleit M et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 2009;68:770-776.
- <sup>59</sup> Rudwaleit M et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777-83.

- 
- <sup>60</sup> Rudwaleit M, et al. The assessment of spondyloarthritis international society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:25–31
- <sup>61</sup> Braun J et al. Prevalence of spondyloarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998;41:58-67.
- <sup>62</sup> Calin A et al. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *JAMA* 1977;237:2613-4.
- <sup>63</sup> Boyer GS et al. Spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis in Alaskan Yupik Eskimos. *J Rheumatol* 1990;17:489-96.
- <sup>64</sup> Khan MA et al. Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med* 2002;135:896-907.
- <sup>65</sup> Bollow M et al. Use of contrast enhanced magnetic resonance imaging to detect spinal inflammation in patients with spondyloarthritides. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(6 Suppl. 28):S167-S174.
- <sup>66</sup> Oostveen J et al. Early detection of sacroiliitis on magnetic resonance imaging and subsequent development of sacroiliitis on plain radiography. A prospective, longitudinal study. *J Rheumatol* 1999;26:1953-8.
- <sup>67</sup> Sampaio-Barros PD et al. Undifferentiated spondyloarthropathies: a 2 year follow-up study. *Clin Rheumatol* 2001;20:201-6.
- <sup>68</sup> Calin A et al. A prospective nationwide cross-sectional study of NSAID usage in 1331 patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1990;17:801-3.
- <sup>69</sup> Feldtkeller E et al. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2003;23:61-66.
- <sup>70</sup> Braun J et al. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007;369:1379-90.
- <sup>71</sup> Spoorenberg A et al. Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1999;26:980-84.
- <sup>72</sup> Kellgren JH. Diagnostic criteria for population studies. *Bull Rheum Dis* 1962;13:291-92.
- <sup>73</sup> Feldtkeller E et al. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2003;23:61-66.
- <sup>74</sup> Appel H et al. Spondyloarthritis at the crossroads of imaging, pathology and structural damage in the era of biologics. *Curr Rheumatol Rep* 2008;10:356-363.
- <sup>75</sup> Song IH, Hermann KG, Haibel H, et al. Relationship between active inflammatory lesions in the spine and sacroiliac joints and new development of chronic lesions on whole-body MRI in early axial spondyloarthritis: results of the ESTHER trial at week 48. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:1257–1263.

- 
- <sup>76</sup> Poddubnyy D et al. Radiographic progression in ankylosing spondylitis/axial spondyloarthritis: how fast and how clinically meaningful? *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:363-369
- <sup>77</sup> Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, et al. Rates and predictors of radiographic sacroiliitis progression over 2 years in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:1369–1374.
- <sup>78</sup> Althoff CE et al. Whole-body MRI as a new screening tool for detecting axial and peripheral manifestations of spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:983-985.
- <sup>79</sup> Maksymowych WP et al. Spondyloarthritis: lessons from imaging. *Arthritis Res Ther* 2009;11:222.
- <sup>80</sup> van der Heijde D, Machado P, Braun J, et al. MRI inflammation at the vertebral unit only marginally predicts new syndesmophyte formation: a multilevel analysis in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:369–373.
- <sup>81</sup> Chiowchanwisawakit P, Lambert RG, Conner-Spady B, Maksymowych WP. Focal fat lesions at vertebral corners on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2011; 63:2215–2225.
- <sup>82</sup> Heuft-Dorenbosch L et al. Combining information obtained from magnetic resonance imaging and conventional radiographs to detect sacroiliitis in patients with recent onset inflammatory back pain. *Ann Rheum Dis* 2006;65:804-08.
- <sup>83</sup> Calin A et al. A new dimension to outcome: application of the Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index. *J Rheumatol* 1999;26:988-992.
- <sup>84</sup> Creemers MC et al. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis* 2005;64:127-129.
- <sup>85</sup> van Tubergen A et al. Development of new syndesmophytes and bridges in ankylosing spondylitis and their predictors: a longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 2012;71:518–523
- <sup>86</sup> Poddubnyy D et al. Baseline radiographic damage, elevated acute phase reactants and cigarette smoking status predict radiographic progression in the spine in early axial spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2011. doi: 10.1002/art.33465. [Epub ahead of print]
- <sup>87</sup> Geijer M et al. The clinical utility of computed tomography compared to conventional radiography in diagnosing sacroiliitis. A retrospective study on 910 patients and literature review. *J Rheumatol* 2007;34:1561-1565.
- <sup>88</sup> Song IH et al. The diagnostic value of scintigraphy in assessing sacroiliitis in ankylosing spondylitis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1535-1540.
- <sup>89</sup> Blum U et al. Magnetic resonance imaging (MRI) for detection of active sacroiliitis – a prospective study comparing conventional radiography, scintigraphy and contrast enhanced MRI. *J Rheumatol* 1996;23:2107-2115.
- <sup>90</sup> Catanoso M et al. Epidemiology of psoriasis arthritis. *Reumatismo* 2012;64(2):66-70



- 
- <sup>91</sup> Gladman DD. Clinical, radiological, and functional assessment in psoriatic arthritis: is it different from other inflammatory joint diseases? *Ann Rheum Dis* 2006;65(Suppl III):iii22-iii24.
- <sup>92</sup> Cervini C et al. Psoriatic arthritis: epidemiological and clinical aspects in a cohort of 1306 italian patients. *Reumatismo* 2005;57(4):283-290.
- <sup>93</sup> Ho PY et al. Investigating the role of the HLA-Cw6 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritides. *Ann Rheum Dis* 2008;67:677-682.
- <sup>94</sup> Moll JMH et al. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3:55-78
- <sup>95</sup> Helliwell PS et al. Classification and diagnostic criteria for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(Suppl II):ii3-ii8.
- <sup>96</sup> Taylor W et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 2006;54(8):2665-2673.
- <sup>97</sup> Bennett RM. Psoriatic Arthritis. McCarty DJ, editor. *Arthritis and allied conditions*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1979. p.645.
- <sup>98</sup> Gladman DD et al. Psoriatic arthritis: an analysis of 220 patients. *Q J Med* 1987;238:127-41.
- <sup>99</sup> Vasey F et al. Psoriatic arthropathy. In Calin A, editor. *Spondyloarthropathies*. Orlando (FL): Grune & Stratton; 1984. p.151-85.
- <sup>100</sup> McGonagle D et al. Psoriatic arthritis: a unified concept twenty years on. *Arthritis Rheum* 1999;42:1080-6.
- <sup>101</sup> Kane D et al. A prospective, clinical and radiological study of early psoriatic arthritis: an early sinovitis clinic experience. *Rheumatology* 2003;42:1460-1468.
- <sup>102</sup> Braun J et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:896-904
- <sup>103</sup> Zochling J et al. ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:442-52.
- <sup>104</sup> Braun J, Pham T, Sieper J, et al. ; ASAS Working Group . International ASAS consensus statement for the use of anti-tumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003 ; 62 : 817 – 24 .
- <sup>105</sup> Braun J, Davis J, Dougados M, et al. First update of the international ASAS consensus statement for the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006 ; 65 : 316 – 20 .
- <sup>106</sup> van der Heijde D et al. 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:905–908

- 
- <sup>107</sup> Zochling J et al. Assessment of ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23(S39):S133-S141.
- <sup>108</sup> Ritchlin CT et al. Treatment recommendations for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1387-1394.
- <sup>109</sup> Gladman DD et al. Consensus on a core set of domains for psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2007;34:1167-70.
- <sup>110</sup> Helliwell PS et al. Do the radiological changes of classic ankylosing spondylitis differ from changes found in the spondylitis associated with inflammatory bowel disease, psoriasis or reactive arthritis? *Ann Rheum Dis* 1998;57:135-40.
- <sup>111</sup> Gossec L et al. European league against rheumatism recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies. *Ann Rheum Dis*. 2011;71:4 – 12.
- <sup>112</sup> Tillett W et al. Treatment algorithms for early psoriatic arthritis: do they depend on disease phenotype? *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:334-342
- <sup>113</sup> Ritchlin CT, Kavanaugh A, Gladman DD, et al. Treatment recommendations for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:1387 – 94.
- <sup>114</sup> Coates LC, Fransen J, Helliwell PS. Defining minimal disease activity in psoriatic arthritis: a proposed objective target for treatment. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:48 – 53.
- <sup>115</sup> Coates LC, Helliwell PS. Validation of minimal disease activity criteria for psoriatic arthritis using interventional trial data. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62:965 – 9.
- <sup>116</sup> Lombardi S et al. Effects of a standardised aerobic exercise program in patients with ankylosing spondylitis stabilized with anti-TNF alpha therapy. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl II):511
- <sup>117</sup> van Tubergen A et al. Cost effectiveness of combined spa-exercise therapy in ankylosing spondylitis: a randomized controller trial. *Arthritis Rheum* 2002;47:459-67.
- <sup>118</sup> Rudwaleit M et al. Use and efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in early ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(Suppl. 1):247.
- <sup>119</sup> Ash Z et al. A systematic literature review of drug therapies for the treatment of psoriatic arthritis: current evidence and meta-analysis informing the EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011.
- <sup>120</sup> Biasi D et al. Efficacy of methotrexate in the treatment of ankylosing spondylitis: a three year open study. *Clin Rheumatol* 2000;19:114-7.
- <sup>121</sup> Dougados M et al. Sulfasalazine in the treatment of spondyloarthritis. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 1995;38:618-27.
- <sup>122</sup> Clegg DO et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of psoriatic arthritis. A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum* 1996;39:2013-20.

- 
- <sup>123</sup> Jones G et al. Interventions for psoriatic arthritis. Cochrane database of Systemic Reviews 2000:CD000212.
- <sup>124</sup> Clegg DO et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of psoriatic arthritis. A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum* 1996;39:2013-20.
- <sup>125</sup> Kane D et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004;50:3286-95.
- <sup>126</sup> Willkens RF et al. Randomized, double-blind, placebo controlled trial of low-dose pulse methotrexate in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 1984;27:376-81.
- <sup>127</sup> Kaltwasser JP et al. Efficacy and safety of leflunomide in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a multinational, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 2004;50:1939-50.
- <sup>128</sup> Hanauer SB et al. 2004. Incidents and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Chron's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2: 542-553
- <sup>129</sup> Markham A, et al. 2000. Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs*: 59: 1341 - 59
- <sup>130</sup> Antoni C et al. Sustained benefits of infliximab therapy for dermatologic and articular manifestations of psoriatic arthritis: results from the infliximab multinational psoriatic arthritis controlled trial (IMPACT). *Arthritis Rheum* 2005;52:1227-36.
- <sup>131</sup> Antoni C et al. Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of the IMPACT 2 trial. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1150-7.
- <sup>132</sup> Braun J et al. Persistent clinical response to the anti-TNF- $\alpha$  antibody infliximab in patients with ankylosing spondylitis over 3 years. *Rheumatology* 2005;44:670-6.
- <sup>133</sup> Baraliakos X et al. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment with the tumour necrosis factor alpha antibody infliximab. *Ann Rheum Dis* 2005;52:582-91.
- <sup>134</sup> van der Heijde D et al. Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomised, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum* 2005;52:582-91.
- <sup>135</sup> Van den Bosch et al. A prospective long-term study of the efficacy and safety of infliximab in 107 patients with spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(Suppl.):S611.
- <sup>136</sup> Brandt J et al. Successful short term treatment of severe undifferentiated spondyloarthritis with the anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody infliximab. *J Rheumatol* 2002;29:118-22.
- <sup>137</sup> Schnarr S et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy with the chimeric monoclonal antibody infliximab in severe undifferentiated spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63(Suppl. 1):422.

- 
- <sup>138</sup> Richard-Miceli C et al. 2001. Tumour necrosis factor-alpha blockers in rheumatoid arthritis: review of the clinical experience. *Biodrugs* 15 (4): 251-9
- <sup>139</sup> Hughes LB et al. 2001. New therapeutic approaches to the management of rheumatoid arthritis. *Biodrugs* 15 (6): 379-93
- <sup>140</sup> Choy P et al. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344: 907-16
- <sup>141</sup> Mease PJ et al. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:385-90.
- <sup>142</sup> Mease PJ et al. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy and effect on disease progression. *Arthritis Rheum* 2004;50:2264-72.
- <sup>143</sup> Gorman JD et al. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. *NEJM* 2002;346:1349-56.
- <sup>144</sup> Braun J et al. International ASAS consensus statement for the use of anti-tumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:817-24.
- <sup>145</sup> Brandt J et al. Successful short term treatment of patients with severe undifferentiated spondyloarthritis with the anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  fusion receptor protein etanercept. *J Rheumatol* 2004;31:531-8.
- <sup>146</sup> Machold KP et al. 2003. Adalimumab: a new TNF- $\alpha$  antibody for treatment of inflammatory joint disease. *Expert Opin Biol Ther* 3: 351-60
- <sup>147</sup> Mease PJ et al. Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:3279-89.
- <sup>148</sup> Genovese MC et al. Safety and efficacy of adalimumab in treatment of patients with psoriatic arthritis who had failed disease modifying antirheumatic drug therapy. *J Rheumatol* 2007;34:1040-50.
- <sup>149</sup> van der Heijde D et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2006;54:2136-46.
- <sup>150</sup> Taylor P et al. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin in Pharmacology* 2010;10:308-315.
- <sup>151</sup> Weisman MH. 2002. What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. *J Rheumatol Suppl.*65: 33-8
- <sup>152</sup> Haibel, H. et al. Efficacy of adalimumab in the treatment of axial spondylarthritis without radiographically defined sacroiliitis: results of a twelve-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial followed by an open-label extension up to week fifty-two. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 1981–1991

- 
- <sup>153</sup> Barkham, N. et al. Clinical and imaging efficacy of infliximab in HLA-B27-Positive patients with magnetic resonance imaging-determined early sacroiliitis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 946–954
- <sup>154</sup> Song, I. H. et al. Effects of etanercept versus sulfasalazine in early axial spondyloarthritis on active inflammatory lesions as detected by whole-body MRI (ESTHER): a 48-week randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70: 590–596
- <sup>155</sup> Certolizumab pegol in subjects with active axial spondyloarthritis. *ClinicalTrials.gov* [online], <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01087762> (2012).
- <sup>156</sup> Study comparing etanercept (ETN) against a placebo for etanercept on a background nonsteroidal anti inflammatory drug (NSAIDs) in the treatment of early spondyloarthritis (SpA) patients who do not have X-ray structural changes (AS EARLY). *ClinicalTrials.gov* [online], <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01258738> (2012).
- <sup>157</sup> Effect of golimumab in participants with active axial spondyloarthritis (P07642) (GO-AHEAD). *ClinicalTrials.gov* [online], <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01453725> (2012).
- <sup>158</sup> Sieper, J. et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis—results of the phase 3 study [abstract 2486A]. *Arthritis Rheum.* 2011;63 (Suppl.): S970–S971
- <sup>159</sup> Baraliakos, X. et al. Persistent clinical efficacy and safety of infliximab in ankylosing spondylitis after 8 years—early clinical response predicts long-term outcome. *Rheumatology* 2011;50:1690–1699
- <sup>160</sup> Martin-Mola, E. et al. Sustained efficacy and safety, including patient-reported outcomes, with etanercept treatment over 5 years in patients with ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2010;28:238–245
- <sup>161</sup> Sieper, J. et al. Early response to adalimumab predicts long-term remission through 5 years of treatment in patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200358>.
- <sup>162</sup> Vastesaeger, N. et al. Predicting the outcome of ankylosing spondylitis therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70:973–981
- <sup>163</sup> Sieper J et al. Developments in therapies for spondyloarthritis. *Nat.Rev. Rheumatol.* 2012; 8: 280-287.
- <sup>164</sup> Haibel et al. Open label trial of anakinra in active ankylosing spondylitis over 24 weeks. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64: 296–298
- <sup>165</sup> Song, I. H. et al. Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-four-week clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62:1290–1297
- <sup>166</sup> Song, I. H. et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with abatacept: an open-label, 24-week pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70: 1108–1110

- 
- <sup>167</sup> Appel, H. et al. Analysis of IL-17 + cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the TH17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13: R95
- <sup>168</sup> Wanders, A. et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2005;52, 1756–1765
- <sup>169</sup> Poddubnyy, D. et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Ann. Rheum. Dis.* [http://dx.doi.org/ 10.1136/annrheumdis-2011-201252](http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201252)
- <sup>170</sup> Fabien BV et al. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Ann Rheum Dis* 2013;72:165-178
- <sup>171</sup> de Vries MK, Brouwer E, van der Horst-Bruinsma IE, et al. Decreased clinical response to adalimumab in ankylosing spondylitis is associated with antibody formation. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1787 – 8.
- <sup>172</sup> van Kuijk AW, de Groot M, Stapel SO, et al. Relationship between the clinical response to adalimumab treatment and serum levels of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:624 – 5.
- <sup>173</sup> Kavanaugh A, Krueger GG, Beutler A, et al. In fl iximab maintains a high degree of clinical response in patients with active psoriatic arthritis through 1 year of treatment: results from the IMPACT 2 trial. *Ann Rheum Dis* 2007;66:498 – 505.
- <sup>174</sup> Ducourau E, Mulleman D, Paintaud G, et al. Antibodies toward in fl iximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R105.
- <sup>175</sup> Wolbink GJ et al. Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:711 – 15.
- <sup>176</sup> St Clair EW et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:1451 – 9.
- <sup>177</sup> Bartelds GM, et al. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum* 2009;60:2541–2.
- <sup>178</sup> Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Nuno L, et al. In fl uence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment of spondyloarthritis with infliximab. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1955 – 60.
- <sup>179</sup> Jamnitski A, Bartelds GM, Nurmohamed MT, et al. The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Ann Rheum Dis* 2011;70:284 – 8.
- <sup>180</sup> Huscher D et al. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1175-83.

- 
- <sup>181</sup> McLeod C et al. Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2007;11:28.
- <sup>182</sup> Wailoo A et al, Infliximab, etanercept and adalimumab for the treatment of ankylosing spondylitis: cost-effectiveness evidence and NICE guidance. *Rheumatology* 2008;47:119-120
- <sup>183</sup> Tran-Duy A et al, A discrete event modelling framework for simulation of long-term outcomes of sequential treatment strategies for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2111-2118
- <sup>184</sup> Olivieri I et al. Pharmacoeconomic issues in psoriatic arthritis. *J Rheum Suppl* 2012;39 (suppl89):103-105.
- <sup>185</sup> Bansback NJ et al. Estimating the cost and health status consequences of treatment with TNF antagonists in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatology* 2006;45:1029-38.
- <sup>186</sup> Eandi M et al. Pharmacoeconomic analysis of biological drugs for the treatment of psoriatic arthritis. *Farmacoeconomia e Percorsi Terapeutici* 2006;7:171-86.
- <sup>187</sup> Bravo Vergel Y, et al. The cost-effectiveness of etanercept and infliximab for the treatment of patients with psoriatic arthritis. *Rheumatology* 2007;46:1729-35.
- <sup>188</sup> Olivieri I et al. The psoriatic arthritis cost evaluation study: a cost-of-illness study on tumour necrosis factor inhibitors in psoriatic arthritis patients with inadequate response to conventional therapy. *Rheumatology* 2008;47:1664-1670.
- <sup>189</sup> Cummins E et al. Cost effectiveness of golimumab for the treatment of active psoriatic arthritis. *Eur J Health Econ* 2012 Dec;13(6):801-9
- <sup>190</sup> J.P. Mira et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999;282:561-568.
- <sup>191</sup> Louis E et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin. Exp. Immunol* 1998; 113:401-406.
- <sup>192</sup> Huizinga TW et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patient., *J. Neuroimmunol.* 1997;72:149-153.
- <sup>193</sup> Mycko M et al. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J. Neuroimmunol.* 1998;84:198-206.
- <sup>194</sup> Wilson AG et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94:3195-3199.
- <sup>195</sup> Verjans GM et al Restriction fragment length polymorphism of the tumor necrosis factor region in patients with ankylosing spondylitis, *Arthritis Rheum* 1991; 349 (4): 486-489.
- <sup>196</sup> Verjans et al. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 1994;97(1):45-47

- 
- <sup>197</sup> Fraile A et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1998;51:386–390.
- <sup>198</sup> McGarry F et al. The –308.1 polymorphism region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. *J. Rheumatol.* 1999;26(5):1110–1116.
- <sup>199</sup> H hler T et al. Differential association of polymorphisms in the TNF alpha region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2002;61(3):213-8.
- <sup>200</sup> H hler T et al. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum* 1998;41(8):1489-92.
- <sup>201</sup> Poddubnyy DA et al. Relation of HLA-B27, tumor necrosis factor-  promoter gene polymorphisms, and T cell cytokine production in ankylosing spondylitis -- a comprehensive genotype-phenotype analysis from an observational cohort. *J Rheumatol* 2011;38(11):2436-41.
- <sup>202</sup> Rudwaleit M et al. Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism *Ann Rheum Dis* 2001;60(1):36–42.
- <sup>203</sup> Sousa E et al. Ankylosing spondylitis susceptibility and severity – contribution of TNF gene promoter polymorphisms at positions -238 and -308. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:581-8
- <sup>204</sup> Vargas-Alarcon G et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum. Immunol* 2006;67(10): 826–832.
- <sup>205</sup> Shiau MY et al. Association of tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms with ankylosing spondylitis in Taiwan. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(4):562–563.
- <sup>206</sup> Lu MC et al Higher LPSstimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from Chinese ankylosing spondylitis patients with –3008(G/A) polymorphism in promoter region of tumor necrosis factor: association with distinct A33/B58/ Cw10 haplotypes. *Rheumatol Int* 2008;29(2):189–195.
- <sup>207</sup> Lee YH et al. Lack of association of TNF-alpha promoter polymorphisms with ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Rheumatology* 2009;48(11):1359-62
- <sup>208</sup> Li B et al. The association between TNF-alpha promoter polymorphisms and ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2010;29(9):983-990.
- <sup>209</sup> Wang C et al. Association between transforming growth factor-alpha polymorphism and ankylosing spondylitis: a meta-analysis update. *Mod Rheumatol.* 2012 Jun2 (epub ahead of print).
- <sup>210</sup> Balding J et al. Cytokine gene polymorphisms: association with psoriatic arthritis susceptibility and severity. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1408-13.



- 
- <sup>211</sup> Rahman P et al. TNFalpha polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65(7):919-23
- <sup>212</sup> Nishibu A et al. Lack of association of TNF-238A and -308A in Japanese patients with psoriasis vulgaris, psoriatic arthritis and generalized pustular psoriasis. *J Dermatol Sci* 2002;29(3):181-4
- <sup>213</sup> Mugnier B et al. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor a gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1849-52.
- <sup>214</sup> Guis S et al. Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor alpha gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;57(8):1426-30.
- <sup>215</sup> Maxwell JR et al. Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 2008;17(22):3532-8.
- <sup>216</sup> Cuchacovich M et al. Tumour necrosis factor (TNF)alpha -308 G/G promoter polymorphism and TNFalpha levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2004;33(4):228-32.
- <sup>217</sup> Marotte H et al. Association between the level of circulating bioactive tumor necrosis factor alpha and the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism at -308 in patients with rheumatoid arthritis treated with a tumor necrosis factor alpha inhibitor. *Arthritis Rheum* 2008;58(5):1258-63.
- <sup>218</sup> O'Rielly DD et al. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2009;9(3):161-7.
- <sup>219</sup> Lee YH et al. Association of TNF-alpha -308 G/A polymorphism with responsiveness to TNF-alpha-blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2006;27(2):157-61.
- <sup>220</sup> Zeng G et al. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) promoter -308 G/A and response to TNF- $\alpha$  blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol* 2012 Jul 4 (epub ahead of print)
- <sup>221</sup> Lee YH et al. Associations between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -308 and -238 G/A polymorphisms and shared epitope status and responsiveness to TNF-alpha blockers in rheumatoid arthritis: a metaanalysis update. *J Rheumatol* 2010;37(4):740-6.
- <sup>222</sup> Pavy S et al. Tumour necrosis factor alpha -308G->A polymorphism is not associated with response to TNFalpha blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(6):1022-8.
- <sup>223</sup> Seitz M et al. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFalpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology* 2007;46(1):93-6
- <sup>224</sup> Boldin MP et al. 1995. Self-association of the "death domains" of the p55 tumour necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signalling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270: 387-391

- 
- <sup>225</sup> Weiss T et al. 1998. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J Immunol* 161: 3136-3142
- <sup>226</sup> Beltinger CP et al. 1996. Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. *Genomics* 35: 94-100
- <sup>227</sup> Morita C et al. 2001. Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum* 44: 2819-27
- <sup>228</sup> Komata T et al. 1999. Association of tumour necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 53: 527-533
- <sup>229</sup> Tsuchiya N et al. 2000. New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human TNFR 2: association with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 1: 501-503
- <sup>230</sup> Nishimura M et al. 2000. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin-alpha, and HLA-DRB 1 gene polymorphisms in human T cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. *Hum. Immunol.* 61: 1262-1269
- <sup>231</sup> Barton A et al. 2001. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* 44: 61-65
- <sup>232</sup> Dieude P et al. 2002. Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum* 46: 2039-2044
- <sup>233</sup> Pierik M et al. 2004. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol. Ther.* 20: 303-310
- <sup>234</sup> Till A et al. 2005. The Met-196 → Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) affects TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by impaired NF- $\kappa$ B signalling and target gene expression. *J Biol Chem* 280 (7): 5994-6004
- <sup>235</sup> Fotin-Mleczek M et al. 2002. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci* 115: 2757-2770
- <sup>236</sup> Glossop JR et al. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(6):R1227-34.
- <sup>237</sup> Teh HS et al. 2000. TNF receptor 2-deficient CD8 T cell are resistant to Fas/Fas ligand-induced cell death. *J Immunol* 165: 4814-4821
- <sup>238</sup> Shibue T et al. 2000. Tumor necrosis factor alpha 5'-flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 753-7

- 
- <sup>239</sup> Dahlqvist SR et al. 2002. Tumor necrosis factor receptor type II (exon 6) and interleukin-6 (-174) gene polymorphisms are not associated with family history but tumor necrosis factor receptor type II is associated with hypertension in patients with rheumatoid arthritis from northern Sweden. *Arthritis Rheum* 46: 3096-8
- <sup>240</sup> Barton A et al. 2001. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* 44: 61-65
- <sup>241</sup> Dieude P et al. 2002. Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum* 46: 2039-2044
- <sup>242</sup> Goëb V et al. Association between the TNFR II 196R allele and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(5):R1056-62.
- <sup>243</sup> Fabris M et al. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:29-33.
- <sup>244</sup> Chatzikyriakidou A et al. Combined tumour necrosis factor-alpha and tumour necrosis factor receptor genotypes could predict rheumatoid arthritis patients' response to anti-TNF-alpha therapy and explain controversies of studies based on a single polymorphism. *Rheumatology* 2007;46:1034-35.
- <sup>245</sup> Ongaro A et al. Can tumor necrosis factor receptor II gene 676T>G polymorphism predict the response grading to anti-TNFalpha therapy in rheumatoid arthritis? *Rheumatol Int* 2008;28(9):901-8.
- <sup>246</sup> Toonen EJ et al. The tumour necrosis factor receptor superfamily member 1b 676T>G polymorphism in relation to response to infliximab and adalimumab treatment and disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1174-7
- <sup>247</sup> Tung CH et al. Association between ankylosing spondylitis and polymorphism of tumour necrosis factor receptor II in Taiwanese patients. *Scand J Rheumatol* 2009;38(5):395-6.
- <sup>248</sup> Chatzikyriakidou A et al. The role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptor polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(4):648-8.
- <sup>249</sup> Koene HR et al. FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*, 1997 ;90 (3):1109-1114
- <sup>250</sup> Radstake TR et al. Role of Fcγ receptors IIA, IIIA, and IIIB in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(5):926-933.
- <sup>251</sup> Milicic A et al. The F158V polymorphism in FcγRIIIA shows disparate associations with rheumatoid arthritis in two genetically distinct populations. *Ann Rheum Dis* 2002;61(11):1021-1023.
- <sup>252</sup> Kastbom A et al. The 158V polymorphism of Fcγ receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: Increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology* 2005;44(10):1294-1298.

- 
- <sup>253</sup> Morgan AW et al. FcγRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: A confirmation study. *Rheumatology* 2003;42(4):528-533.
- <sup>254</sup> Nieto A et al. Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(4):735-9.
- <sup>255</sup> Lee YH et al. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol* 2008;35(11):2129-35.
- <sup>256</sup> Ranganathan P. An update on pharmacogenomics in rheumatoid arthritis with a focus on TNF-blocking agents. *Curr Opin Mol Ther* 2008;10(6):562-567.
- <sup>257</sup> Louis E et al. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19(5):511-519.
- <sup>258</sup> Cartron G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2001;99: 754-8
- <sup>259</sup> Quartuccio L, Lombardi S, Fabris M, Masolini P, Saracco M, Pellerito R, De Vita S. Long-term effects of rituximab in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1173:692-700
- <sup>260</sup> Tutuncu Z et al. 2005. Fcγ receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor α- blocking agents. *Arthritis e Rheum*, 52 (9): 2693-2696
- <sup>261</sup> Kastbom A et al. Fcγ receptor type IIIA genotype and response to tumor necrosis factor α- blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(2):448-452.
- <sup>262</sup> Cañete JD et al. Influence of variants of Fc gamma receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(10):1547-52.
- <sup>263</sup> Morales-Lara MJ et al. Association between the FCGR3AV158F polymorphism and the clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2010;39:518-527
- <sup>264</sup> Fabris M, Sacco S, Lombardi S et al. Polimorfismi genici e risposta ai biologici anti-TNF-alfa nelle spondiloartriti sieronegative: effetto differenziale degli stessi siti polimorfici sui differenti farmaci. *Reumatismo* 2008;Vol. 60, N. 3 (*Numero Speciale 1*):187
- <sup>265</sup> Ramirez J et al. FCGR2A/CD32A and FCGR3A/CD16A variants and EULAR response to tumor necrosis factor-α blockers in psoriatic arthritis: a longitudinal study with 6 months of follow-up. *J Rheumatol* 2012;39(5):1035-41
- <sup>266</sup> Garrett S et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994 Dec;21(12):2286-91.